Molekulargewichtsbestimmung von Eiweißkörpern

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Karl Mayer
aus München

Dissertations-Druckerei Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)
1936

Molekulargewichtsbestimmung von Eiweißkörpern

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Karl Mayer

aus München

Dissertations-Druckerei Heinr. & J. Lechte, Emsdetten (Westf.)

1936

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Professor Siegfried Edlbacher.

Tag der Promotion: 9. März 1936

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis.

— — — —

I. Einleitung.

Wenn wir das Molekulargewicht der hochmolekularen organischen Verbindungen bestimmen wollen, so wird sich zunächst die Frage erheben, ob wir bei diesen Stoffen überhaupt von einem Molekül sprechen dürfen. Die Antwort wird nicht ohne weiteres ja lauten dürfen, da der klassische Molekülbegriff sich auf die Gasphase bezieht. Das Molekül ist dort als die kleinste Einheit definiert, die noch alle chemischen Eigenschaften des, in gasförmigem Zustand befindlichen Stoffes zeigt, die sie bei weiterer Zerteilung verlieren wird. Auch für wahre Lösungen ist der Begriff des Moleküls eindeutig festlegbar, da von den Eigenschaften der Lösungen auf unendliche Verdünnung extrapoliert und dann auf die Eigenschaften der Gasphase geschlossen werden darf. Nun sind aber die Eiweiß-Stoffe wie auch viele andere hochmolekulare organische Naturstoffe (Zellulose, Kautschuck u. a.) nicht in die Gasphase überführbar, da die Molkohäsion bei weitem größer ist als die Stabilitätsgrenze dieser Körper, d. h. es kommt eher zur Zersetzung als daß sich die Moleküle von einander trennen würden. Es ist dies eine typische Eigenschaft der Hochmolekularen, die aber freilich auch konstitutiv bedingt ist, (wie Karrer 62 berechnet hat). Aus eben denselben Gründen ist es nun unmöglich zu sagen, ob in einer Lösung diese Körper in molekularer Zerteilung vorliegen oder nicht. Wäre die Molkohäsion wesentlich durch die polaren Gruppen (z. B. NO, OH, NH) bedingt, so würden einer Auflösung nicht die Schwierigkeiten entgegenstehen, wie es tatsächlich der Fall ist, da gerade die polaren Gruppen besonders gern Wasser wegen seines hohen Dipols anziehen. Es müßte also zu einer starken „Solvatation" kommen, und die, durch die Hauptvalenzen in sich verbundenen Moleküle müßten sich gut von einander trennen. Andererseits erklären K. H. Meyer und H. Mark (76), daß die einzelnen kleinsten Einheiten der Moleküle sich in wässriger Lösung mit ihren „hydrophilen", gut polarisierbaren Gruppen nach außen gegen das Wasser stellen, während die „lipophilen" (unpolarisierbaren, nach Loeb „oeligen") Gruppen (z. B. CH, CH_2, Phenyl) sich gegenseitig abschirmen und sich vor der Flüssigkeit schützen. Diese Annahme steht auch mit den Versuchsergebnissen Langmuirs (Zit. n. Wo. Ostwald 84a) in Übereinstimmung, wonach sich beim Ausbreiten eines Tropfens Fettsäure oder Eiweiß, (Spreitung genannt) auf einer Wasseroberfläche die polarisierbaren Gruppen der Wasserfläche zukehren, während die lipophilen Gruppen „bürstenartig" in die Luft ragen. (s. a. St. J. v. Przylecki und M. Z. Grynberg 89). Nach Versuchen von Dimroth (26) tragen gewisse Atomgruppen, die ähnlich im Molekül gelagert sind, zur Löslichkeit proportional zu ihrer Anzahl bei.

Wenn keine intramolekularen Komplikationen zwischen den Lösungsmitteln eintreten würden, so könnte vielleicht eine Mischung von Lipoid-Lösungsmittel und einem anderen, stark polarisierbaren eine weitgehendere

Zerteilung der Eiweißkörper in Lösungen ermöglichen als es bis jetzt der Fall war. Durch Messung der Lösungswärme und des osmotischen Drucks der Lösung könnte dann die immer weiter fortschreitende Zerteilung verfolgt werden und der optimalste Mischungsgrad ermittelt werden, woraus sich dann vielleicht wieder Schlüsse auf die chemische Struktur der gelösten Stoffe ziehen ließen. An Nitrozellulose wurden von Highfield (54) bereits Versuche unternommen, der die Ergebnisse aber viskosimetrisch prüfte.

Auch für den festen kristallisierten Zustand ist von Weißenberg (zit. nach 49 und 76) eine Hypothese der kleinsten Einheiten entwickelt worden. Es läßt sich aus kristallographischen und chemischen Ueberlegungen eine Kristallbasiszelle entwickeln, aus der durch Verschieben in allen Richtungen der Makrokristall aufgebaut werden kann. Diese überlegungen wurden durch röntgenographische Untersuchungen vollauf bestätigt. Könnte man bei den Eiweißkörpern auch eine Basiszelle entwickeln, so würde sie ein einfaches, in den meisten übrigen Fällen nicht allzugroßes Vielfaches des Moleküls darstellen (oder, welche Fälle bei anderen organischen Stoffen auch realisiert wurden, identisch mit ihm sein). Gerade bei anderen hochmolekularen, organischen Naturstoffen (Zellulose und Kautschuk) hat sich nun ergeben, daß in diesem Fall die Basiszelle einer Schraubenachse gleichkommt, sodaß das Molekül theoretisch unendlich lang ist und daher auf Grund dieser Theorie nichts über seine Größe gesagt werden kann. Überdies erhält man bei den meisten Eiweißstoffen keine Daten mit der Röntgenmethode, da die „Störung des Gitters durch unregelmäßige Verteilung der Kettenenden und durch Enklaven" (49) zu groß ist, trotzdem sie makroskopische Kristalle bilden können.

Eine einfache und allgemeine Definition für das Molekül bei den Hochmolekularen ist die Definition, die K. H. Meyer und H. Mark in ihrem Buch (76) geben; nämlich: daß bei Hauptvalenzbindung der Abstand der beteiligten Atomschwerpunkte 1,1—1,6 Å, bei Nebenvalenzbindung 3—4 Å ist.

Wenn man das Molekül als Summe der Atome auffaßt, deren Abstände kleiner als 1,7 Å sind, (nach van der Wijk 114) so ist damit ein eindeutiger Begriff geschaffen, der auch für den Gaszustand gültig ist, freilich gerade bei den hier ins Auge gefaßten Substanzen nicht immer nachprüfbar ist.

Es entsteht nun die Frage, wie sich die Eiweißstoffe in verschiedenen Lösungsmitteln tatsächlich verhalten werden. Bereits vorher wurde erörtert, daß die lipophilen Gruppen infolge ihrer gegenseitigen Affinität es erschweren, daß sich die einzelnen Moleküle von einander trennen. Es soll jedoch betont werden, daß eine mehr oder weniger weitgehende Assoziation von Eiweißmolekülen in Lösung nicht der Grund für ihr kolloidales Verhalten ist. Staudinger (104) betont nachdrücklich, daß (wie er an synthetischen Produkten, die einwandfrei molekulardispers gelöst waren, nachweisen konnte) sich die Hochmolekularen stets (und nicht nur je nach dem Lösungsmittel wechselnd wie z. B. die Seifen und die meisten anderen Stoffe) kolloidal lösen, d. h., daß sie Quellung und hohe Viskosität in relativ verdünnter Lösung zeigen. Der Grund für dieses merkwürdige Verhalten ist die außerordentliche Größe ihres Moleküls. In zweiter Linie darf man ihn frei-

lich auch darin suchen, daß mit dem Wachsen des Moleküls und besonders mit Zunahme der polaren Gruppen die van der Waalsschen Kräfte (Molkohäsion) zunehmen, sodaß sich die Moleküle immer schwerer von einander trennen werden, je größer sie sind.

Es ist nun schon lange bekannt, daß sich hochmolekulare Stoffe gewöhnlich nicht in die einzelnen „Moleküle" d. h. die durch Hauptvalenzen zusammengehaltenen Einheiten, sondern in größere Einheiten verteilen. Die durch Hauptvalenzen zusammengehaltenen kleinsten Einheiten sind aber nach Ansicht der meisten Autoren immer noch so groß, daß sie sich als Molekülkolloide verhalten. Fodor (32b) nimmt auf Grund chemischer Überlegungen an, daß 7—18 von diesen Komplexen in der Gelatine zu größeren Einheiten vereinigt sind, während sie Meyer so groß werden läßt, daß sie in manchen Fällen die Größe der kleinsten Komponentensysteme (34.000 bei Ovalbumin) erreichen würden. Sørensen (102c) entwickelt die Anschauung, daß es sich bei den, in vitro erhaltenen Eiweißkörpern um reversibel, dissoziable Komponentensysteme handelt, die sich infolge der starken Kräfte, die sie untereinander tätigen, ähnlich wie chemische Individuen verhalten, und daß sich in biologischem Material auch ganz andere Komponentensysteme je nach dem augenblicklich herrschenden Gleichgewichtszustand zusammenfinden können. M. Frankel, ein Mitarbeiter Fodors (32a) hat gezeigt, daß in Gelatine bei verschiedener Temperatur verschiedene Teilchengrößen vorhanden sind, da beim Erwärmen Dissoziation der Komponentensysteme eintritt. Diese Versuche wurden auch schon früher in großer Zahl ausgeführt, jedoch wurde die Änderung des osmotischen Drucks (aus welcher Frankel seine Schlüsse zog) auf eine Verkleinerung der Hydratation der Moleküle zurückgeführt, d. h. man nahm an, daß das Wasserbindungsvermögen der Moleküle mit höherer Temperatur sich verringere und daß darauf allein die Verringerung des osmotischen Drucks zurückzuführen sei. Frankel (33b) bemerkt auf einen Einwand von Eggert und Bincer (29a, b), daß bei den geringen Konzentrationen, die er benützte, die Solvatation keine ausschlaggebende Rolle bei der Verringerung des osmotischen Drucks gespielt haben dürfte. In ähnlicher Weise wurde auch schon von Loeb (70) aus den Viskositätsschwankungen von Gelatinelösungen auf Änderung der Teilchengröße geschlossen.

Die einzelnen Komponenten, die sich zu Komponentensystemen vereinigen, müssen nicht alle gleichartig sein. So nehmen K. H. Meyer und H. Mark in Seidenfibrin „Mischmizellen" (Mischkomponentensysteme nach Sørensen) aus verschiedenen „Hauptvalenzketten" (wie sie die „Komponenten" nennen) an. Als ein Ziel der Forschung darf es bezeichnet werden, einheitliche Stoffe zu schaffen, wobei die einheitlich zusammengesetzten Mizellen oder Komponentensysteme (oder „Sekundärteilchen" nach Zsigmondy 120) ebenso groß sein können wie die Mischmizellen, jedoch nur eine andere chemische Zusammensetzung haben werden. Die kleinsten Einheiten werden sie allerdings nicht sein, sondern Vielfache davon. Durch die kohäsiven Kräfte wird bei bestimmter Konzentration, Reaktion, Temperatur und Salzgehalt immer eine bestimmte Größe der Mizellen resultieren, die sich bei manchen Proteinen mit Änderung der genannten Umstände stark ändern kann, bei manchen (wie wahrscheinlich beim Ovalbumin) konstant

gehalten wird. Als Beispiel für ein sehr unstabiles, aber leicht zu gewinnendes Komponentensystem nennt Sørensen (102c) das Serumglobulin. Die Löslichkeit von Serumglobulin in Salzlösung steigt mit der Menge des dabei angewandten Proteins. Sørensen erklärt dies so, daß dann wahrscheinlich sowohl das undissozierte Komponentensystem „als auch die daraus gebildeten, weniger komplizierten Dissoziationsprodukte mit dem Salz oder dessen Ionen Verbindungen eingehen. Diese Verbindungen sind indessen von höchst ungleicher Löslichkeit und durch die Behandlung eines Globulinniederschlags mit einer Salzlösung, die zur vollständigen Lösung des Globulins nicht hinlänglich konzentriert ist, werden uns die.... bei der gegenwärtigen Salzkonzentration löslichen Dissoziationsprodukte in Lösung gehen. Fügt man mehr Ausgangsmaterial hinzu, dann dissoziert sich auch dieses und die am leichtesten löslichen Dissoziationsprodukte gehen in Lösung." (Sørensen). Da die auf übliche Weise gewonnenen Serumglobuline wohldefinierte Körper sind, kann man bei ihnen aber auch nicht schlechtweg von einem Gemisch reden. Schon beim Verdünnen entsteht eine starke Dissoziation, die sich durch erhöhten osmotischen Druck und beim Abzentrifugieren dadurch äußert, daß ein Teil des Eiweißkörpers nicht zentrifugierbar ist. Weizenmehlgliadin wurde durch Abkühlen der Lösung bis —12° fraktioniert. Beim Vereinigen der Fraktionen ergab sich dann wieder das Ausgangsmaterial.

Auch das Serumalbumin ist sehr unstabil, Sørensen schließt aus eigenen Versuchen und einem Befunde Svedbergs, daß es sich hier ebenfalls um reversible Dissoziationen handelt, darum, weil die einzelnen Fraktionen kristallisieren, wenn sie wieder gelöst und in normaler Weise behandelt werden, was sie nicht tun, wenn sie wirklich gespalten werden und weil sie sich normal mit der Ultrazentrifuge absetzen, also auch das gleiche Molekulargewicht haben. Bei chemischen Reaktionen und Quellungen würden sich die Komponentensysteme oder wie Meyer und Mark sie nennen, ihre Mizellen wie aus einfachen Molekülen bestehend verhalten, d. h. es käme der reagierende Stoff an alle Stellen innerhalb der Mizellen und es bliebe nicht bei reinen Oberflächenreaktionen. In dieser Hinsicht dürfte also den Mizellen keine besondere biologische Funktion zukommen. Allerdings dürfte in die Mizellen Wasser eingeschlossen werden können und besonders dann, wenn die Mizellen sich miteinander vereinigen, wobei Wasser in großer Menge eingeschlossen wird und schließlich Gelierung eintritt.

Dadurch, daß die Mizellenbestandteile Wasser aufnehmen und trotzdem die Mizelle erhalten bleibt, läßt sich die Quellung und die hohe Viskosität der Eiweißlösungen erklären, da das, in den Mizellen enthaltene Wasser seine freie Beweglichkeit verloren hat. J. Loeb (70) glaubte sogar die in den Mizellen eingeschlossenen Wassermengen mittels des Donnan'schen Membrangleichgewichts berechnen zu können, doch dürften sich seine Annahmen heute als unberechtigt herausgestellt haben. Eine andere Annahme über die hohe Viskosität der Eiweißlösungen machen Staudinger und Trommsdorf (106a). Diese glauben, daß sich die ionisierten Einzelmoleküle oder Komponenten mit ihren apolaren, lipophilen Teilen vor dem Wasser schützen und die polaren Teile und die Ionen solvatisiert werden, sodaß

auch in diesem Fall ein Komponentensystem (wenigstens in ionisiertem Zustand) entstehen würde. Dadurch, daß eine Mizelle von zahlreichen Alkaliionen oder Säureresttionen umgeben ist, soll eine Art gegenseitige Festlegung der Mizellen erfolgen, durch die die hohe Viskosität von Lösungen dieser Art erklärt würde. Ob beim Eiweiß, wo vermutlich die Ionen, polare und apolare Gruppen sich mitten im Molekül und nicht nur an den Endgruppen, wie bei den synthetischen Produkten befinden, eine solche Gruppierung möglich ist, erscheint aber zweifelhaft.

Dem Gebrauche von Sørensen und Svedberg folgend, sei das Gewicht eines Gemisches von N (= Avogadrosche Konstante = 6×10^{23}) Teilchen als Molekulargewicht bezeichnet, wobei man sich darüber klar sein muß, daß es sich um das Durchschnittsmolekulargewicht der Komponentensysteme und der davon abdissoziierten Hauptvalenzkomponenten handelt, sodaß es also weitgehend vom Dissoziationsgrad des Proteins abhängig ist. Es ist nicht sicher identisch mit dem auf Seite 2 postulierten Molekularbegriff. Der von anderer Seite (K. H. Meyer, Handovsky 120) vorgeschlagene Name Mizellargewicht wurde nicht verwandt, da bei dieser Größe das, von der Mizelle eingeschlossene Wasser bei Molekulargewichtsbestimmungen mit einbezogen wird. Das Mizellargewicht müßte also bei geringen Temperatur- und Reaktionsunterschieden weitgehende Schwankungen aufweisen, was es aber nach den Svedbergschen Untersuchungen (welche die unumstrittensten sind), nicht tut.

(Die Anschauung, daß die Proteine aus kleineren Komponenten, die nicht durch Hauptvalenzen verbunden seien, bestünden, äußerte übrigens bereits 1911 Cohnheim (23) und 1920 E. Stiasny (105) auf Grund der Pepsinspaltung von Proteinen in Peptone.)

An dieser Stelle seien noch einige Worte über eine Theorie verloren, die sich grundsätzlich nicht von den eben vorgetragenen unterscheidet und die von verschiedenen Forschern hauptsächlich auf Grund der Röntgenstruktur und der Molekulargewichtsbestimmung aus dem osmotischen Druck und der Gefrierpunktserniedrigung in organischen Lösungsmitteln aufgestellt wurde und die sich dadurch auszeichnet, daß sie den Hauptvalenzkomponenten (die sich untereinander durch Nebenvalenzen verbinden und so das Eiweißmolekül aufbauen) nur ein Molekulargewicht von einigen hundert zugesteht. Man nahm an, daß es sich bei diesen „Individualgruppen" vielleicht um Diketopiperazine (Ringkörper, Aminosäuren, Anhydride) handle. Diese Ansicht vom Aufbau der Eiweißkörper wird heute kaum mehr aufrecht erhalten. Sie entstand insbesondere durch die Forschung der Zellulosechemie (da sich die Basiszelle der Zellulose als sehr klein erwies) und wurde durch sie auch wieder verworfen, indem H. Staudinger an Hand seiner synthetischen Hochmolekularen in überzeugender Weise dartun konnte, daß sich gerade bei Zellulose die beobachteten Erscheinungen durch große Moleküle, die aus Hauptvalenzen aufgebaut sind, erklären lassen.

Die Anschauung des Proteinaufbaus aus sehr kleinen Bausteinen wurde von Herzog (46d, 50) und Troensegaard (108a) propagiert und besonders von E. Abderhalden (1) und M. Bergmann (19a) zur Diskussion gestellt. Auch E. Waldschmidt-Leitz (111) hält es für

möglich, daß wenigstens Seidenfibroin und andere unlösliche Eiweißstoffe aus Diketopiperazinen aufgebaut seien, während er diese Möglichkeit für lösliche Eiweißstoffe bestreitet, da bei der Pepsinspaltung Polypeptide resultierten. Auf Zweifel, die in die Versuche selbst gesetzt wurden, soll später eingegangen werden. Schon die Theorie aber macht es unwahrscheinlich, daß solch kleine Moleküle in derartig starker Weise mit einander verknüpft sind. Die kohäsiven Kräfte müßten aus einem besonders hohen Dipolmoment oder extremer Polarisierbarkeit einzelner Atomgruppen resultieren; da man die Dipolmomente der einzelnen Gruppen kennt, so kann man die Stärke der Assoziationskräfte einschätzen und kommt zu ganz wesentlich niedrigeren Resultaten. Überdies müßten diese Kräfte eine spezifische Richtung haben, z. B. beim Seidenfibroin längs der Faserachse, da in dieser Richtung der Zusammenhalt besonders hoch ist (nach Meyer und Mark). Bergmann (19b) selbst, der früher die Lehre von den kleinen Bausteinen vertrat, nimmt neuerdings beim Clupein peptidische Bindung an.

II. Besonderheiten der Osmometrie von Eiweißkörpern.

Der Osmotische Druck in seiner Beziehung zum Molekulargewicht ist sehr häufig der Gegenstand theoretischer Überlegungen gewesen. Es sei hier nur die van t'Hoffsche und die van der Waalsche Gleichung erwähnt. Was den osmotischen Druck von Eiweißlösungen betrifft, so fanden sich sehr bald Schwierigkeiten, da der osmotische Druck von jedem, bis dahin bekannten Gesetz abwich, sobald der Eiweißlösung Salze zugesetzt wurden, d. h. ursprünglich wollten sich bei der Osmometrie überhaupt keine Gesetzmäßigkeiten ergeben. F. G. Donnan (zit. nach 87a, b, 120) hat in diese Verhältnisse Klärung gebracht, durch seine Theorie des Membrangleichgewichts, die er an kolloidalen Farbstoffen bestätigte. Die Theorie ist allerdings nur für ideale Lösungen gedacht, hat aber die Aufklärung des osmotischen Verhaltens kolloidaler Stoffe erst ermöglicht. J. Loeb und seine Schüler versuchten aus dem Donnanschen Membrangleichgewicht die Quellung und die Viskosität von Gelatinelösungen zu erklären, jedoch wurden diese weitgehenden Folgerungen von den meisten anderen Untersuchern später wieder abgelehnt.

Die ungewöhnlichen Abweichungen des osmotischen Drucks entstehen durch die Eigenschaft des Eiweißes, außerhalb des isoelektrischen Punktes dissoziierende Salze zu bilden. Die Gegenionen der Proteinionen können frei passieren, die Proteinionen werden in der Osmometerzelle festgehalten. Dadurch entsteht das Donnansche Membrangleichgewicht, das durch das Gesetz, daß die Produkte aus der Konzentration der Ionen eines beliebigen Ionenpaares in der Innenflüssigkeit und desselben Ionenpaares in der Außenflüssigkeit einander gleich sind, ausgedrückt ist.

Befindet sich z. B. in einer Lösung ein Natriumsalz mit nicht dialysablem Anion R- und durch eine semipermeable Wand davon getrennt, eine $Na^{\cdot}Cl'$ — Lösung, so ist anfänglich:

Na^+	R^-	|	$Na^{\cdot}$	Cl'
c_1	c_1	|	c_2	c_2

semipermeable Membran

(c = Äquivalentkonzentrationen)

Da das Kochsalz diffundieren wird und die Äquivalentkonzentration des nach links diffundierenden Kochsalzes x sei, so ist im Gleichgewicht:

Na^+	R^-	Cl'	|	$Na^{\cdot}$	Cl'
c_1+x	c_1	x	|	c_2-x	c_2-x

Nach der Donnanschen Theorie:

$$(c_1 + x)\, x = (c_2 - x)^2$$

$$x = \frac{c_2^2}{c_1 + 2c_2}$$

und dann:

$$\frac{(NaCl)a}{(NaCl)i} = \frac{(Cl)a}{(Cl)i} = \frac{c_2 - \frac{c_2^2}{c_1 + 2c_2}}{\frac{c_2^2}{c_1 + 2c_2}} = 1 + \frac{c_1}{c_2}$$

(a = außenbefindlich, i = innenbefindlich).

Ist c_2 groß gegenüber c_1, so wird $\frac{c_1}{c_2}$ sich null nähern und die Salzverteilung in den beiden Zellen sich ausgleichen. Wird c_1 groß gegen c_2, so wird $\frac{c_1}{c_2}$ einen hohen Wert annehmen und das Salz wird, da (NaCl)a gegen (NaCl)i groß ist, zum größten Teile in der Außenzelle des Osmometers sein und den osmotischen Druck, der vom Kolloid ausgeübt wird, stark herabdrücken.

Die Messung des osmotischen Drucks kann auf drei Arten statthaben:

1.) bei isoelektrischer Reaktion. Das Eiweiß bildet keine Jonen. Beigefügte Salze diffundieren frei aus und ein und verteilen sich gleichmäßig innen und außen.

2.) Bei hoher Salzkonzentration. Die Salzverteilung wird innen und außen gleich. Der osmotische Druck des Eiweißes wird nicht beeinträchtigt, da sich wieder, wie bei 1, der osmotische Innen- und Außendruck des Salzes aufhebt.

3.) Unter Berücksichtigung des Donnangleichgewichts und unter Subtraktion des, von den Außenionen ausgeübten osmotischen Druckes von dem gemessenen.

Zu berücksichtigen ist jeweils auch, wie stark die Dissoziation des Eiweißes durch die anwesenden Salze beeinträchtigt wird. Daß auch bei Kenntnis des Donnanschen Membrangleichgewichts der osmotische Druck der Eiweißlösung noch lange nicht gesetzmäßig erfaßt werden kann, soll später bei den praktischen Messungen und im folgenden gezeigt werden. Trotz Berücksichtigung der Dissoziation zeigen die starken Elektrolyte Abweichungen von den Gesetzen des osmotischen Drucks, die durch das Debye-Hückelsche Gesetz erfaßt werden. Darin wird postuliert, daß die elektrostatischen Kräfte, die zwischen den Jonen der Lösungen wirken, die Abweichung verursachen. (zit. nach Hammersten (45).

Hammersten (45) hat eine andere Anomalie festgestellt. Der osmotische Druck eines Salzes mit großem Anion war kleiner als der aus der Jonenkonzentration berechnet. Hammersten erklärt dies so, daß die kleinen Kationen osmotisch unwirksam waren, da sie in den Lücken der Atomkomplexe der voluminösen Anionen verschwanden und kinetisch nicht in Erscheinung treten konnten. Mit ansteigendem Molekularvolumen der Anionen wurde der Fehler in der Berechnung des osmotischen Druckes immer größer. Wird das kleinere Jon durch immer größere vertauscht, so wird der Fehler kleiner, der Druck wächst wieder.

Trotz all dieser Schwierigkeiten kennen wir die Größe mehrerer Eiweißmoleküle, die durch Osmometrie ermittelt und durch andere Methoden bestätigt wurde.

III. Molekulargewichtsbestimmung aus osmotischen Messungen.

Die ersten Forscher auf dem Gebiete des osmotischen Drucks der Proteinlösungen konnten die außerordentlichen Schwierigkeiten, die der Versuch mit sich bringt, den osmotischen Druck der Eiweißkörper in Beziehung zum Dispersitätsgrad zu bringen, noch keineswegs übersehen. Die Bestimmung der Teilchengröße war bei diesen ersten Versuchen auch noch nicht das Ziel der Forschungen, wenn auch Martin bereits überschlägt, wie groß das Molekulargewicht der angewandten Stoffe dann sei, wenn seine Ergebnisse die tatsächlichen osmotischen Drucke enthielten.

Die ersten Hinweise auf osmotische Drucke in Eiweißen finden sich schon sehr früh in der Literatur. So erwähnt Pfeffer (88) außer seinen eigenen Versuchen über flüssigen Leim (eine 6%ige Lösung ergab 24 cm Hg Druck), Verhältniszahlen von Dutrochet (1837) über die osmotische Wirkung von Gelantinewasser, Gummi- und Rohrzuckerlösung und Hühnereiweiß. Diese letzteren Zahlen sind alle durch die Nichtberücksichtigung der um ein Vielfaches größeren Kristalloidwirkung durchaus falsch, wie auch schon Pfeffer bemerkt hat. Baranetzky (8) fand für gereinigtes Albumin nur eine ganz geringe osmotische Wirkung.

Der erste Experimentator, der den Druck von nativen Serumprotein maß, war E. H. Starling (103a, b). Er gedachte durch Abfiltrieren der kolloiden Eiweißkörper aus Serum ein Filtrat zu gewinnen, das nur die nichtkolloidalen Bestandteile des Blutes enthielt. Eine Serumprobe, welche die Bluteiweißkörper noch enthielt und welche sich in einer Osmometerzelle befand, die mit einem Steigrohr versehen war, wurde in ein größeres Gefäß, das das Serumfiltrat (oder auch in den ersten Versuchen 1895 eine Ringerlösung) enthielt, eingelassen. Die molare Konzentration war im Innern der Zelle größer, da die Serumproteine nicht herausdiffuadieren konnten. Die Elektrolytkonzentration sah Starling für gleich groß an. Daher übte die Lösung in der Zelle einen osmotischen Druck aus. Das Gleichgewicht, kenntlich am längeren Stillestehen des Flüssigkeitsspiegels im Steigrohr stellte sich nach längerem Stehen (einige Tage) ein. Starling (103b) erhielt für den osmotischen Druck des Gesamtproteins Werte zwischen 3—4 mm Hg pro 1% Protein. (Bei Osmometrie gegen Serumfiltrat etwas höhere als bei den Versuchen mit Ringerlösung als Außenflüssigkeit). Die ganze Apparatur war in einem Brutofen bei 16° untergebracht, da die Osmometerzelle bei Temperaturschwankungen wie ein Thermometer wirkt. Die semipermeable Membran bestand aus Goldschlägerhäutchen (bzw. Peritonealmembran) und war mit Gelatine abgedichtet. Sie war über einen Zylinder von Silberdrahtnetz gespannt, um das Volumen der Zelle konstant zu erhalten. Diese letztere Einrichtung ist später von verschiedenen Untersuchern ebenfalls, wenn auch modifiziert, benützt worden.

Anläßlich der Konstruktion eines Ultrafilters aus Kieselsäure und Gelatine teilt C. J. Martin (74) mit, daß er nach osmometrischen Versuchen mit seinen Kieselsäuremembranen, die Eiweißkörper nicht mehr, (wohl aber Eiweißabbauprodukte) passieren lassen, das Gewicht der Elementarteilchen von Serumalbumin auf 20.000 bis 30.000 schätze, ein Wert, der größenordnungsmäßig später bestätigt wurde. Er bemerkt, daß der osmotische Druck der untersuchten Stoffe dem Gasgesetz $P = P_0 (1 + a t)$ folgt.

Um gewissermaßen ex faustibus den osmotischen Druck zu messen, benützt Koeppe (64) den Haematokriten. Dies ist ein Gerät, das den Grad der Quellung der Erythrozyten, die ihrer Haemolyse vorausgeht, zu messen gestattet. Je stärker hypotonisch die Lösung ist (je kleiner also ihr osmotischer Druck ist), die über die Erythrozyten geschichtet wird, desto stärker quellen sie. Koeppe findet keinen Unterschied in der Quellung seiner Blutkörperchen, ob er proteinfreies Filtrat von Hühnereiweiß oder rohes Hühnereiweiß überschichtete. Er fand also, daß Eialbumin mit seinem Apparat keinen osmotischen Druck zeigte. Wie sich später herausstellte, übt jedoch Eialbumin, wenn er nur mit feineren Apparaten und Versuchsanordnungen gemessen wird, sehr wohl einen osmotischen Druck aus.

Die nächsten Untersucher B. Moore und W. H. Parker (77) erhalten bereits durchgehend gut meßbare Drucke für Eiweißkörper verschiedenster Art. In ihrer Arbeit wird schon diskutiert, ob es sich bei dem Gewicht des Eiweißelementarteilchens, das nach der bekannten Formel $P = \frac{RTC}{M}$ (wobei P der osmotische Druck, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, C die Konzentration des gelösten Stoffes und M sein Molekulargewicht sind) gewonnen ist, tatsächlich um das Molekulargewicht im üblichen Sinne handelt oder ob es nicht vielmehr das Gewicht von mehreren Molekülen ist, die sich assoziiert in Lösung befinden. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß sich wahrscheinlich immer mehrere Moleküle zu einer „osmotischen Einheit" vereinigt hätten. Diese osmotische Einheit soll durch völlige Dialyse verändert werden, weil sich für völlig dialysiertes Eialbumin ein doppelt so großes Molekulargewicht aus den Versuchen errechnen läßt als bei gewöhnlich gereinigtem. Sie deuten dies als Aggregation von je 2 Elementarteilchen. Bei Temperaturerhöhung verkleinert sich der osmotische Druck und auch bei Salzzusatz schwankt der osmotische Druck ihrer Lösungen beträchtlich. Durch spätere Untersuchungen wurde aber festgestellt. daß der Temperaturkoeffizient des osmotischen Druckes nicht negativ, sondern positiv ist, und daß der Salzzusatz ganz besonders komplizierte Verhältnisse zeitigt, die von der Theorie der Membrangleichgewichte behandelt werden.

1904 veröffentlichte E. W. Reid (93a) seine erste Untersuchung, in der er nach Würdigung der vorhergehenden Arbeiten mit einem Starlingschen Osmometer und Peritoneal-Gelatine-Membranen (Außenflüssigkeit destilliertes Wasser) zu recht wenig ermutigenden Schlüssen gelangte. Auf Grund der Beobachtung, daß verschiedene Vollsera sehr verschiedene kolloidosmotische Drucke ergeben, glaubt Reid, daß die eigentliche Ursache für diese osmotischen Drucke nicht Eiweißkörper, sondern andere (dialysable) Stoffe seien. Er reinigt daher Serumalbumin und Ovalbumin weitgehend und erhält

dann gar keinen osmotischen Durck. Sørensen (102a) bemerkt in der historischen Übersicht seiner Arbeit, daß sich aus all den Versuchen Reids in seiner ersten Arbeit keine zuverlässigen Schlüsse ziehen ließen, da die Versuchsresultate allzu stark unter einander differieren. In einer zweiten Arbeit untersucht Reid (93b) den osmotischen Druck von kristallisiertem Hämoglobin. Als Membran wird echtes Pergament benützt, die Konzentration des Hämoglobins wird nach Hüfner nach der Farbtiefe der Lösung festgesetzt. Das Osmometer wird 24—36 Stunden geschüttelt, um bestimmt einen Gleichgewichtszustand herbeizuführen. Dies wird dadurch kontrolliert, daß der erreichte osmotische Druck 48 Stunden lang gleichbleiben muß. Reid findet für je 1% Hämoglobin in Lösung bei 15° ca. 3,5 bis 3,8 mm Hg osmotischen Druck, also einen 2—3mal kleineren Druck als Hüfner und Ganßer in ihrer Arbeit, aus der sie ein Molekulargewicht für Hämoglobin von 16.000 errechneten.

Der Arbeit von Hüfner und Ganßer über den osmotischen Druck von Hämoglobin lief eine andere Arbeit (58a) voraus, die sich mit der Sauerstoffkapizität des Blutes befaßt und in der die Methoden, mit denen dann in der folgenden Arbeit die Konzentrationen und die Sauerstoffsättigung gemessen wurden, ausgearbeitet wurden. Auf Grund der Eisenbestimmung glauben die Autoren, daß 1 Molekül Eisen, 1 Molekül Sauerstoff bindet und daß das Molekulargewicht von Hämoglobin mindestens 16.000 betrage. 1907 wurde von Hüfner und Ganßer erstmalig eine ganz genaue und wie es schien eindeutige Messung des osmotischen Drucks von Hämoglobin vorgenommen. Als Membranen dienten Diffusionshülsen von Schleicher und Schüll, Ausgangsstoff war dreimal umkristallisiertes Ochsen- und Pferde-Hämoglobin. Bis der Maximaldruck, der als wahrer osmotischer Druck angesehen wurde, erreicht war, dauerte es 24 Stunden. Die Versuche waren in guter Übereinstimmung mit einander und es wurde ein Molekulargewicht von 15.000 für Pferdehämoglobin und von 16.300 für Ochsenhämoglobin errechnet.

In einer Reihe von Arbeiten (78a, b, 80a, b), die meist in „The Biochemical Journal“ erschienen sind, haben Moore und Roaf ihre Ansichten niedergelegt. Die erste Arbeit (78a) galt vor allem der Untersuchung der Frage, ob der osmotische Druck von Proteinen tatsächlich nur von Verunreinigungen herrühre, die langsam durch die Membran diffundieren, wie dies E. W. Reid in seiner ersten Arbeit annahm. (Das Versuchsmaterial von Moore und Roaf war Schweineserum, die Membran bestand aus Pergamentpapier, Gegenflüssigkeit war destilliertes Wasser). Sie gelangen zu einer strikten Verneinung dieser Auffassung vom Ursprung des proteinosmotischen Druckes. Die Verfasser fanden bei Serumprotein, Gelatine, Gummi arab. und Dextrin meßbaren, osmotischen Druck. Kristalloide, die durch Absorption und chemische Bindung an die Kolloide geknüpft sind und deshalb nicht dialysabel sind, müssen als intregrierende Bestandteile des Kolloids betrachtet werden. Ohne sie sind die Kolloidpartikel in Lösung nicht stabil und aggregieren. Änderung des Salzgehaltes der Lösung führt zur Änderung des Aggregationszustandes und damit des osmotischen Druckes. Reid habe in Versuchen, wo er keinen osmotischen Druck beobachten konnte, durch die Vorbehandlung (Waschen, Fällen, usw.) die Neutralsalze so weit

verloren, daß der zu untersuchende Stoff derart aggregiert wäre, daß der osmotische Druck zu klein geworden wäre, um gemessen werden zu können.

Es muß erwähnt werden, daß bereits diese beiden Autoren eine reversible Aufspaltung der Lösungsaggregate bei Temperatursteigerung annahmen. Sie folgerten dies daraus, daß der osmotische Druck bei ihren Versuchen nicht proportional, sondern stärker mit der Temperatur anstieg. Bei 80° u. m. findet eine, nur sehr langsam reversible, Aufteilung der Lösungsaggregate statt. Bei Zusatz von Neutralsalz (der aber zum Ausfällen noch nicht genügte) zeigte sich eine starke Verminderung des osmotischen Drucks.

In einer folgenden Arbeit der Liverpool-Schule von Adamson und Roaf (2) ausgeführt, wird mit denselben Mitteln wie bei den vorigen Versuchen der Einfluß von Säuren und Alkalien auf den osmotischen Druck geprüft. Als Versuchsmaterial diente wiederum Schweineserum. Die Außenflüssigkeit im Osmometer war jedoch nicht destilliertes Wasser, sondern 0,9%ige Kochsalzlösung. Bei dem Versuch, der ohne Säure- und Alkali-Zusatz gemacht wurde, fand sich pro 1% Eiweiß ein Druck von 3,7 mm Hg, was einem Durchschnittsmolekulargewicht von 46.000 entspricht. Bei Säurezusatz (HCl) erfolgte ein Abfall des osmotischen Drucks (bis gegen null) so lange, bis die zugesetzte Säure den Alkaligehalt der Serumasche aufwog. Dann erfolgte ein Ansteigen des osmotischen Druckes bis zu einem Maximum. Bei weiterem Zusatz erfolgte wieder ein Absinken. Bei Alkalizusatz (NaOH) zum Serum erfolgte sofort Anstieg des Druckes bis zu einem Maximum, auf das dann ebenfalls bei weiterer Alkalizugabe ein Abfall erfolgte. Dieses Verhalten hatte Roaf (95b) 1910 in einer Arbeit bei Serumproteinen beobachtet und folgende Erklärung, die sich später als völlig richtig erwies, gegeben: „The explanation of these results is believed to be the formation of ionising saltes of proteins with acids and bases. Excess of electrolyte diminishes ionisation and also causes aggregation of the colloid.

Der schließliche Abfall des osmotischen Druckes wurde bei der Säure partieller Präzipitation, bei der Lauge der Bildung von Zersetzungsprodukten und Diffusion von diesen, zugeschrieben. Ähnliche Ergebnisse fanden sich nach Sørensen in einer Arbeit über das Kasein von Moore, Roaf und Webster.

Eine Übersicht über die erschienenen Arbeiten haben A. R. Moore und H. E. Roaf (79) unter dem Titel: „Osmotischer Druck der Proteine und seine biologische Bedeutung“, erscheinen lassen. Roaf (95a) hat außerdem den osmotischen Druck von Hämoglobin, das durch Dialysieren von Kuhblut gewonnen war, untersucht. Er fand die Größe der Lösungsaggregate des Hämoglobins von ca. 15.000 bis 30.000. Als Außenflüssigkeit wurde destilliertes Wasser und Natriumbichlorat und Natriumcarbonatlösung verwandt.

Mit ähnlichen Methoden wie Moore und Roaf arbeitete R. S. Lillie (68). Er experimentierte mit Kollodiummembranen, Ovalbumin und Gelatine, welche beide, wie er selbst zugibt, nicht ganz rein waren. Auch seine Arbeit gilt vor allem dem Bestreben, den Einfluß verschiedener Nichtkolloide auf den kolloidosmotischen Druck klarzustellen. Um die Diffusion

zu beschleunigen, bringt er gleich anfänglich das zugesetzte Nichtkolloid in der Innen- und Außenflüssigkeit des Osmometers auf gleiche Konzentration. Er bestätigt und nimmt teilweise auch die später erschienenen Ergebnisse vonn Moore und Roaf in Bezug auf Säure- und Alkali-Einfluß voraus. Gedanklich möchte Lillie keinen so großen Unterschied, wie es gewöhnlich geschieht, zwischen Quellung und osmotischem Druck gemacht wissen. Auch der Temperatureinfluß auf den osmotischen Druck der Gelatine wird in einem Versuch geprüft.

In diese Zeit fällt auch die Veröffentlichung der für den kolloid-osmotischen Druck fundamentalen Theorie Donnans, die dieser auf Grund von Versuchen an kolloiden Farbstoffen aufstellte, und die bereits an anderer Stelle behandelt wurde.

In einer Reihe von Veröffentlichungen von W. Biltz über die Kolloide und ihren osmotischen Druck erschien auch eine Abhandlung über den osmotischen Druck der Gelatine (12 a, b, c). Die Apparatur, die in früheren Abhandlungen genau beschrieben wird, besteht aus einem Platin-Netzkorb, in den eine Kollodiummembran eingeführt ist, die u. U. noch mit Ferrocyankupfer gedichtet werden kann. Zur Verhinderung der Fäulnis wird zu der Gelatinelösung etwas Thymol hinzugefügt. Zur Kontrolle des ungestörten Versuchsverlaufes (d. h., daß keine Fäulnis und keine Verluste durch undichte Membranen eingetreten waren) wurden vor und nach dem Versuch Zähigkeitsmessungen durchgeführt. Da der osmotische Druck durch das Altern der Gelatinelösungen nach Erreichen eines Druckmaximums allmählich abnimmt, so wird der wahre osmotische Druck, der ohne das Altern der Lösungen eintreten würde, auf folgende Weise ermittelt: man stellt das Osmometer a) auf einen sehr hohen Druck und wartet dann, bis es stark abfällt, b) man stellt es wie gewöhnlich auf den Druck null ein und nimmt ebenso wie bei a) auch hier eine Druck-Zeitkurve auf. Bei a) zeigt diese Kurve erst einen raschen Abfall, der dann immer langsamer wird, wobei sich die Kurve allmählich null nähert, bei b) einen relativ schnellen Anstieg, der dann immer langsamer auf einen Abstieg gegen null zugeht. Beide Kurven bleiben aber stets in einem gewissen Abstand von einander, wenn sie sich auch sehr nahe kommen. Zieht man eine Linie, die zwischen den beiden Kurven verläuft und extrapoliert sie auf die Zeit null, so hat man den wahrscheinlichsten osmotischen Druck (Adair und Burk und Greenberg konnten später ein Zusammenfließen beider Kurven erreichen). Die Messungen wurden bei 20° und einer Gelatinekonzentration von 0,1—0,2% durchgeführt. Das Molekulargewicht der Gelatine wurde je nach Fabrikationsprodukt zu 10.000 bis 20.000 berechnet. Der Aschengehalt wurde bewußt unberücksichtigt gelassen. Noch eine interessante Tatsache sollte sich auch hier, wie sie schon von Biltz bei den Dextrinen beobachtet worden war, ergeben: die Goldzahlen der Gelatinesorte waren ihrem Molekulargewicht antibat, die Zähigkeit war dem Molekulargewicht symbat. Beide Daten waren aber leider nicht proportional, sodaß Biltz keine quantitativen Rückschlüsse von Zähigkeit und Goldzahlen einer Gelatine auf ihr Molekulargewicht machen konnte. In einem Anhang zu der Arbeit wird sorgfältig dialysiertes Pferdeserumeiweiß bei 1—2° osmometriert. Es wurden die Molekulargewichte auf ca. 50.000

bis 70.000 geschätzt. Ein Versuch gab allerdings einen abnorm hohen Druck, aus dem sich ein Molekulargewicht von nur 32.000 berechnen ließ.

Mit ganz außerordentlich feinen Mitteln und großem Aufwand an Zeit und Material hat S. P. L. Sørensen (102a) im Carlsberglaboratorium, Kopenhagen die Frage des osmotischen Druckes und des Molekulargewichts des Ovalbumins bearbeitet. Die theoretische Basis für seine Untersuchungen bildete die Donnan-Theorie. Das Material ist besonders gut gereinigtes und wohl definiertes Ovalbumin, die semipermeable Membran ist ein Kollodiumhäutchen. Zur Verhinderung der Fäulnis wird während des Versuches toluolgesättigte, kohlensäurefreie Luft durch die Außenflüssigkeit des Osmometers geblasen. Die Theorie, nach der die Drucke berechnet werden, ist die Donnansche Theorie der Membrangleichgewichte, die daraufhin modifiziert ist, daß das Eialbumin amphoteren Charakter hat. Man kann durch die angestellten Berechnungen dann das Verteilungsverhältnis des zugesetzten Salzes und seiner Jonen in der Innen- und Außenflüssigkeit berechnen und daraus den wahren osmotischen Druck der nichtdiffusiblen Eieralbuminverbindungen ableiten. Das Salz wird deshalb zugesetzt, weil sich das Eiweiß auch in natürlichem Zustande in einer Salzlösung befindet. Kennt man das Verteilungsverhältnis des Salzes, so ist es möglich, die Versuchsbedingungen (hauptsächlich die Konzentration des Eiweißes, der Salze und der Wasserstoffionen) so zu wählen, daß das Verhältnis, in welchem das Salz (es wurde mit Ammoniumsulfat gearbeitet) sich in Innen- und Außenflüssigkeit verteilt, sehr nahe an 1 ist. Dadurch wird bewirkt, daß der sogenannte Donnansche Gegendruck, also der Druck, den die Jonen des Salzes infolge ihrer ungleichen Verteilung bewirken, in Wegfall kommt. „Das Verhältnis ist 1 umso näher, je niedriger die Konzentration des Albumins und je höher die des Ammoniumsulfats ist. Bei einer Wasserstoffionenkonzentration, die etwas höher als der isoelektrische Punkt des Eieralbumins gelegen ist, wird die Differenz $c_1\alpha - c'_1\alpha'$ (c_1 = Konzentration das am Eiweiß gebundenen NH_4OH, c'_1 = Konzentration der gebundenen H_2SO_4, α und α' die jeweiligen Dissoziationskonstanten. K. M.) gleich null, und bei dieser Wasserstoffionenkonzentration ist das Verteilungsverhältnis deshalb genau gleich 1, die Größe der Protein- oder der Ammoniumsulfat-Konzentration unangesehen. Sowohl bei höheren als bei niedrigeren Wasserstoffionenkonzentrationen ist das Verhältnis größer als 1 und die Abweichung vom Werte 1 wächst verhältnismäßig stärker mit der Abnahme als mit der Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration'" (Sørensen). Wird bei Innehaltung dieser Wasserstoffionenkonzentration bei Änderung eines anderen Faktors (z. B. der Ammoniumsulfatkonzentration) der osmotische Druck pro Einheit des Eiweißes geändert, so schließt Sørensen daraus, daß eine Aggregation oder Desaggregation des Eiweißes stattgefunden hat. Adair hat diese Abweichung, so wie viele andere dadurch zu erklären versucht, daß die verwandten Lösungen bei weitem gegen die Gesetze der idealen Lösungen verstoßen.

Zur Ausführung der Messungen wurde ein eigens konstruierter Osmometer benutzt, bei dem der Gegendruck bestimmt wird, der so groß wie der osmotische Druck der Lösung ist. Die Osmometerzelle besteht ähnlich wie bei den anderen Verfahren aus einem Säckchen aus halbdurchlässiger

Membran (es wurde, wie oben erwähnt, ein Kollodiumhäutchen verwandt), das wasserdicht an eine Glaskapillare mit feinster Längseinteilung angeschlossen ist. Die Osmometerzelle taucht in ein Bad, das einen Rührapparat und ein Thermometer enthält und in ein unversilbertes Dewargefäß eingebracht ist, das in einem Standgefäß steht. Dieses wiederum wird beim Versuch in einen Wasserthermostaten eingetaucht. Das Kapillarrohr wird mit dem Gegendruckapparat verbunden. Dieser besteht einfach aus 2 Glaskolben A und B, die oben und unten Rohrstutzen tragen und von denen einer (B) fest montiert ist. Die unteren Rohrstutzen sind durch einen langen Gummischlauch mit einander verbunden. Von den oberen Rohrstutzen endet der eine frei, der andere, der an dem festmontierten Kolben sitzt, ist durch ein T-Rohr einerseits direkt mit dem Kapillarrohr, andererseits mit einem Manometer verbunden. In die beiden Glaskolben wird, bevor sie an das System angeschlossen werden, so viel Wasser eingefüllt, daß, wenn beide gleich hoch stehen, das Wasser in ihnen etwa halbhoch steht. Nun wird der montierte Kolben B mit Gummischläuchen mit dem Manometer, das null zeigt und dem Osmometer verbunden. Tritt nun ein osmotischer Druck auf, so steigt die Eiweißlösung im Kapillarrohr hoch. Außerdem sinkt das Wasser in B etwas und steigt in A. Hebt man den Kolben A in die Höhe, so entsteht in B ein Druck, der dem osmotischen Druck entgegenwirkt (da die Kolben A und B als kommunizierende Gefäße wirken), der Flüssigkeitsspiegel in B und die Eiweißlösung im Kapillarrohr sinken. Den herrschenden Innendruck zeigt das Manometer an.

Bei einer Messung des osmotischen Druckes wird erst die innere und dann die äußere Zelle des Osmometers mit Flüssigkeit gefüllt und zwar wird die Außenflüssigkeit gleich so gewählt, daß sie sich nach der Donnantheorie mit der Innenflüssigkeit in ungefährem Diffusionsgleichgewicht befindet. Trotzdem wartete man gewöhnlich noch einen Tag damit, bis sich bestimmt das Gleichgewicht einstellte. Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels der Osmometerkapillaren wird mit dem Mikroskop abgelesen und es hat sich nach Sørensen gezeigt, daß die Geschwindigkeit, mit welcher der Meniskus in den Osmometerkapillaren steigt und sinkt, mit der Differenz zwischen dem angewandten Gesamtgegendruck (bestehend aus dem Manometerdruck plus dem Druck aus dem Niveauunterschied zwischen Flüssigkeitsspiegel der Osmometerkapillare und der Außenflüssigkeit) und dem osmotischen Druck proportional ist, solange diese Differenz nicht allzu groß ist. Durch einige wenige Messungen kann man dann, am anschaulichsten graphisch, den wahren osmotischen Druck ermitteln. Sørensen macht dies, indem er die angewandten Gegendrucke als Abszisse, die Änderung des Kapillarmeniskus pro 10 Minuten als Ordinate aufträgt. Mehrere Messungen müssen auf einer Geraden liegen, deren Schnittpunkt auf der Abszissenachse den tatsächlichen osmotischen Druck wiedergibt. Es werden in einer Serie ca. 5 verschiedene Drucke angewandt. Der wahre osmotische Druck muß dann bei den zeitlich auseinander liegenden Serien gleich sein. Während einer Serie muß die Temperatur konstant gehalten werden, oder Temperaturschwankungen müssen in Rechnung gesetzt werden. Meistens wurde bei Temperaturen um 18° gemessen. Nach Abschluß aller Messungen, die einige (3) Tage lang dauern, wird die Innen- und Außenflüssigkeit des Osmometers analysiert.

Nach den theoretischen Überlegungen sollte der korrigierte osmotische Druck $\mathfrak{P} = \pi\ \varepsilon$ sein, wobei ε die Eiweißkonzentration, berechnet auf Volumen des Dispersionsmittels und π eine für Eialbumin von bestimmter Temperatur charakteristische Konstante $= \frac{\mathfrak{R}\ \mathfrak{T}}{\mu}$ (wobei μ die Zahl der Stickstoffatome pro Lösungseinheit) ist. Dies trifft aber nicht zu, sondern der osmotische Druck der Proteineinheit ändert sich mit wechselnder Zusammensetzung der Lösung. „Innerhalb des Gebiets der Ammoniumsulfat- und Wasserstoffionen-Konzentration, über welche sich die Versuche ausdehnen, nimmt π mit wachsender Ammoniumsulfatkonzentration ab. Erst bei einem einigermaßen großen Gehalt an Ammoniumsulfat beginnt jedoch diese Abnahme des osmotischen Drucks Fahrt zu nehmen, sodann wird sie aber mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration stetig und stark fortgesetzt". (Sørensen). Die quantitative, rechnerische Ausdeutung dieser Änderungen ist nicht völlig eindeutig möglich gewesen, sie werden aber nach Sørensen hauptsächlich durch 3 Faktoren bedingt:

„1.) Die elektrolytische Dissoziation eventueller Albuminsalze unter Bildung elektrostatisch festgehaltener, diffusibler Jonen...

2.) Die Wirkung eines ev. Donnanschen Gegendrucks, und

3.) eine ev. Änderung des Dispersitätsgrads der dispersen Phase."

Fehler systematischer Art scheinen nicht vorzuliegen da, ganz nach der Theorie, die Verteilung des beigefügten Salzes in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich ist, wie durch Analysen gezeigt werden kann. Dafür spricht auch, daß unter „normalen Versuchsbedingungen" die osmotischen Drucke ganz verschiedener Ovalbuminpräparate, sehr gut übereinstimmen. Ein Mangel in der Versuchsanordnung, der darin besteht, daß das Kollodiumhäutchen sich bei der Messung infolge der Druckänderung nachträglich zusammenzieht oder ausdehnt, wurde rechnerisch kompensiert. „Die wesentlichste Ursache des, mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration beobachteten Sinkens des osmotischen Drucks ist nach unserem Dafürhalten, ... in einem mit wachsender Ammoniumsulfatkonzentration abnehmenden Dispersitätsgrad der dispersen Phase zu suchen, oder anders gesagt, dieses Sinken ist einer mit der Ammoniumsulfatkonzentration wachsenden Kondensation von 2 oder vielleicht von mehreren Eihydratpartikeln zu einer einzigen Partikel zu verdanken. Diese Kondensation stellen wir uns vor, wird mittels der divalenten SO_4-Gruppe etabliert und da die Kurven zeigen, daß der osmotische Druck der Lösung ungefähr zur Hälfte verkleinert wird, wenn der Ammoniumsulfatgehalt so stark vergrößert wird, daß die Kristallisation des Eihydrats anfängt, so liegt es nahe, das Verhältnis ganz einfach dadurch zu erklären, daß die Eihydratpartikel, je nachdem die Ammoniumsulfatkonzentration wächst, unter Bildung eines Eihydratsulfats je 2 und 2 zusammentreten, welches Sulfat dann, wenn die Konzentration eine angemessene Größe erreicht hat, auskristallisiert." (Sørensen).

Dazu wird angeführt, daß bei ammoniumchloridhaltigen Lösungen der osmotische Druck bei Vergrößerung des Chloridgehaltes nur eine ganz unwesentliche Abnahme erfährt, da es in diesem Falle keinen divalenten

Säurerest gibt, der die Eihydratpartikel verknüpfen kann. Auch mit steigender Wasserstoffionenkonzentration nimmt die Kondensation zu. Bei hoher Wasserstoffionenkonzentration wird dagegen der osmotische Druck infolge Dissoziation des gebildeten Proteinsalzes und dem dann merkbar werdenden Donnanschen Gegendruck steigen.

Schließlich kommt Sørensen fußend auf der Formel P_o (korrigierter osmotischer Druck) $= \frac{R\,T}{u}$ (wobei RT bei der Versuchstemperatur konstant ist und u die Anzahl der Stickstoffatome pro Albuminpartikel ist), dazu, daß das Gewicht einer Eieralbumineinheit 34.000 beträgt, ein Wert, der später vielfach Bestätigung fand.

Eine weitere Anwendung der Donnantheorie bei Eiweißkörpern hat H. C. Wilson (115) zum Autor, der mit Pferdehämoglobin arbeitet. Bei reinem Hämoglobin erhält er in seiner ersten Arbeit eine Molekelgröße von 16.669. Außerdem bestätigt er, daß Hämoglobin mit CO_2 und Essigsäure ionisierende Salze bildet.

Keine solch besondere Rücksicht auf das Donnan-Gleichgewicht nimmt R. C. Smith (100) bei einer Arbeit über „Osmosis and Swelling of Gelatin". Er benutzt besonders gereinigte aschefreie Gelatine und Kollodiummembranen. Die Drucke folgen nach Smith dem van t'Hoffschen Gesetz. Als Molekulargewicht von Gelatine enthält er 96.000.

Eine Methode der Molekulargewichtsbestimmungen von Eiweißkörpern, die wahrscheinlich auch auf Osmose basiert, ist in ihrer Anwendung an Kasein von Jamakami beschrieben worden. Die Methode ist von Barger erfunden und an zahlreichen (niedermolekularen) organischen Stoffen ausprobiert worden. Das Prinzip der Methode ist nach Barger (9): „Series of drops taken from two solutions, the one of the standard, the other of a given solution, of which the molecular weight of the solute is determined, are alternatively introduced into a capillary tube (1—2 mm lichte Weite) and the change in the lengths of the drops is studied by means of a micrometer. If one series of drops is observed to have increased while those alternating with them have decreased it is to be assumed that the solution from which the former series of drops are taken, has a higher molecular concentration than the latter". Barger erklärt diese Erscheinung dadurch, daß der Tropfen mit der niedrigeren molekularen Konzentration so weit verdampft, bis er ebenso konzentriert ist, (also den gleichen Dampfdruck hat) wie sein Nachbar, der von ihm durch einen schmalen Luftspalt getrennt ist. Nach Jamakami (61) ist das Phänomen größtenteils dadurch bedingt, daß durch eine ganz dünne Flüssigkeitsschicht, die beim Einfüllen in der Kapillarwand in der ganzen Länge entsteht, da die Tropfen alle auf derselben Seite aufgesaugt werden, ein Austausch von Flüssigkeit zu dem stärker konzentrierten Tropfen stattfindet. Nachdem Jamakami das Äquivalentgewicht des Kaseins bestimmt, nimmt er das Molekulargewicht der Kaseinionen in Lösung zu 2000 an, ein Wert, der allerdings im Vergleich mit anderen Autoren sehr unwahrscheinlich erscheint. Da die Flüssigkeitsschicht an der Kapillarwand, durch welche die Osmose stattfindet, nicht semipermeabel ist, so kann immer nur festgestellt werden, ob eine Zu- oder Abnahme der Tropfenlänge stattgefunden hat, was ein ziemlich rohes Meßverfahren

darstellt. Unerklärt ist auch, welche Rolle das Donnangleichgewicht in diesem Falle spielt, sowie ob die Methode für solch hohe Molekulargewichte, wie sie die Eiweißkörper besitzen, mit Erfolg angewendet werden kann.

In einer Reihe von Untersuchungen über Gelatine aus dem Imp. Coll. of Science and Technol., London erscheint auch ein Artikel von E. H. Horne (56): „The osmotic Pressure of Gelatine in Solutions of Sodium Salicylate". Die Gelatine wird in erhöhter Konzentration untersucht, damit man den osmotischen Druck besser ablesen kann. Um die Konzentration erhöhen zu können, ohne Gelatinieren befürchten zu müssen, wird dem Lösungsmittel Salicylsäure beigegeben. Diese wirkt nur physikalisch auf die Gelatine ein, was daraus geschlossen wird, daß der Vorgang absolut reversibel ist und bei Entfernen des Natriumsalicylates die Gelatine wie üblich geliert. Das Druckmaximum stellte sich nach 6—7 Tagen ein. In 3%iger Lösung errechnet Horne ein Molekulargewicht von 16.000, in 0,9%iger Lösung dagegen nur von ca. 40.000. Das Membrangleichgewicht wird nicht eigens in Rechnung gezogen.

In seinen umfassenden Untersuchungen hat Adair als erster die Richtigkeit der Anwendung der Donnanschen Gesetze bei Messungen des Molekulargewichts von Eiweißkörpern, bestritten. Er glaubt, daß die Abweichungen von den Gesetzen, die für ideale Lösungen gelten, durch die interionischen und und intermolekularen Kräfte trotz der Einführung von Korrektionsgliedern zu groß sind, um die Anwendung von modifizierten Donnanschen Formeln rechtfertigen zu können. Durch Benutzung der Daltonschen Formeln von den Partialdrucken in der Abänderung von Gibbs, glaubt Adair, erfolgreicher das wahre Molekulargewicht bestimmen zu können. Der osmotische Druck der Eiweißkörper berechnet sich darnach aus dem beobachteten osmotischen Druck abzüglich des Drucks, der infolge der ungleichen Verteilung der diffusiblen Ionen entsteht. Die osmotische Druckdifferenz der diffusiblen Ionen der Innen- und Außenflüssigkeit berechnet Adair nach thermodynamischen Methoden oder aus dem Membranpotential, wobei auch ihre Anziehungs- und Abstoßungskräfte bei den Verhältnissen, wie sie durch die ungleiche Verteilung bedingt sind, berücksichtigt werden müssen.

Da der osmotische Druck, der auf diese Weise berechnet wurde, nicht proportional mit der Proteinkonzentration, sondern schneller wächst, wird durch Einführung von Volumkonstanten ähnlich wie in der van der Waalschen Gleichung der osmotische Druck korrigiert. Adair hat für die verschiedenen Proteinkonzentrationen verschiedene empirische Formeln zur Berechnung dieses korrigierten Druckes aufgestellt. Eine Formel für den Konzentrationsbereich von 0—0,8, eine zweite von 0,8—4,0, eine dritte bis 20 und schließlich für den gesamten Konzentrationsbereich. Diese letztere beinhaltet einen Faktor, der mit der Konzentration wächst.

Dem Referat der einzelnen Arbeiten Adairs sei noch ein kurzes Wort über seine Versuchsmethodik vorausgeschickt. Sie wird in seiner ersten Arbeit über das Hämoglobin ausführlich wiedergegeben und auch später fast immer innegehalten. Als semipermeable Membran dient ein Kollodiumhäutchen. Der Druck wird je nach Höhe teils im offenen Steigrohr, teils im Hg-Manometer abgelesen. Die Messungen sind zur Verhinderung der Fäulnis meist bei 0° ausgeführt. Es wird bewiesen, daß die Lösungen un-

verändert bleiben, daß die Kollodiummembranen undurchlässig sind und daß es sich bei dem erreichten osmotischen Druck um ein tatsächliches Gleichgewicht handelt.

Zuerst hat Adair seine Theorie und seine Versuchsanordnung an einer Reihe von Untersuchungen über das Hämoglobin bewährt (3a, b, c, d, e, f, g). Die Prüfung des benützten Endproduktes des Pferdehämoglobins auf seine Reinheit wurde durch Leitfähigkeitsmessungen vorgenommen. Es zeigte sich, daß das Hämoglobin über einen recht weiten Konzentrations- und Wasserstoffionenkonzentrations-Bereich stets gleiche Molekülgröße hat. Das Molekulargewicht wurde zu 67.000 bis 68.000 ermittelt. Gegenflüssigkeit waren Phosphatpufferlösungen. Auch bei Schafhämoglobin erhielt man ein ähnliches Molekulargewicht von 68.300. Mit dem Hydratwasser berechnete sich das Molekulargewicht dieses Proteins zu 82.800. Auf Grund seiner Formeln konnte Adair unter Ausnützung der experimentellen Ergebnisse anderer Autoren die Molekulargewichte verschiedener Eiweißkörper anders bewerten. So kommt er auf ein Molekulargewicht von 43.000 für Ovalbumin nach den Daten Sørensens. Für Serumalbumin fand Sørensen ein Molekulargewicht von 45.000, Svedberg ein solches von 68.000. Adair (15) findet bei verschiedenen Präparaten (1—4 mal kristallisiert) und verschiedener Konzentration (1—5 gr/100 ccm Lösungsmittel) stets ein gleiches Molekulargewicht von 69.000 bis 75.000. Bei Umrechnung der Ergebnisse von Sørensen mit der Adairschen Formel ergab sich aus dessen Messungen für Serumalbumin ein ähnlich hohes Molekulargewicht von 70.000 bis 72.000.

Auch der Aggregationszustand von Pferdeserumglobulin wurde von Adair (5) untersucht und für sehr stabil gefunden. Er änderte sich z. B. bei Temperaturschwankungen von 1—37° nicht.

Adair faßt seine Ergebnisse über Pferdeserumalbumin und -Globulin in folgender Weise zusammen: „Since the observed and the theoretical values off π_0 (osmotischer Druck) agree in the case of sera of three different species, it seems justifiable to infer firstly that the methods used in this work causes little or no change in the state of aggregation of albumin or globulin and secondly that the proteins in diluted serum are a mixture rather than a compound of albumins and globulins".

Keine feststehenden Molekulargewichte konnten Adair und Roche (96) bei der Untersuchung des osmotischen Drucks von verschiedenen Globinfraktionen feststellen. Das Globin ändert bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration und bei verschiedener Eiweißkonzentration seinen Aggregationszustand. Es konnte daher auch der osmotische Koeffizient nicht exakt berechnet werden und daher sind die Molekulargewichte bei den verschiedenen Lösungen nur annäherungsweise festzustellen. Sie schwanken bei den Versuchsverhältnissen wie sie Adair anwandte von 30.000 bis 150.000.

Etwas außerhalb dieser Reihe von Untersuchungen von Bluteiweißkörperchen fällt eine Untersuchung über den osmotischen Druck von konzentrierten Gelatinelösungen von Adair und E. H. Callow (4). Gelatine wurde mit Magnesiumchloridlösungen versetzt. Die Versuchsanordnung war die

bei Adairs Versuchen übliche. Die Kriterien, die Adair aber bei Hämoglobin aufgestellt hatte, und die, wenn innegehalten, ein tatsächliches osmotisches Gleichgewicht, keine Veränderung der zu untersuchenden Substanz während der Versuchsdauer u. s. f. verbürgen, konnten bei Gelatine nicht erfüllt werden. Die Verfasser lehnten es daher ab, das Molekulargewicht der Gelatine abzuschätzen. Dagegen wurde eine thermodynamische Formel, die die Hydratation der Gelatine darstellt, entwickelt, die allerdings mehrere empirische Konstanten enthält. Die Formel fußt auf dem Satz, daß: „If a protein is hydrated, the difterence between the density (D') of the protein solution and the density (D") of the solution of crystalloids in equilibrium with the protein solution must be effected by the amount of water, combined with the protein."

Weitere Arbeiten über den osmotischen Druck der Eiweißkörper sind von E. B. Verney (110) sowie von Eggert und Reitstötter (30) erschienen. Ersterer maß den osmotischen Druck aller Eiweißkörper des Serums in toto und seine Abhängigkeit von der Konzentration. Letztere maßen das Molekulargewicht von Gelatine. Sie widmeten insbesondere der Hydratation besondere Aufmerksamkeit und wiesen z. B. darauf hin, daß das Molekulargewicht der Gelatine ganz verschieden ausfallen muß, je nachdem man zur Konzentrationsbestimmung lufttrockene oder im Trockenschrank getrocknete Gelatine benützt. So beträgt das Molekulargewicht von elektrodialysierter Gelatine 340.000 (lufttrocken) bis 34.000 (im Trockenschrank). Sie nehmen auf Grund des Äquivalentgewichts an, daß die Gelatineteilchen Mizellen sind, die ihrerseits aus ca. je 50 Primärteilchen (Elementarmolekeln) aufgebaut sind.

Im Hinblick auf thermodynamische Beziehungen haben sich auch Marrack und Newitt (73a, b) mit dem osmotischen Druck der Eiweißkörper befaßt. In ihrer ersten Arbeit über das Thema: „The effect of hydrogen ion concentration and protein concentration on the osmotic pressure of serum" geben sie allerdings keine Umrechnung über den Aggregationszustand der verwandten Gesamtseren, jedoch wird der Druck-Konzentrationsbeziehung besondere Aufmerksamkeit geschenkt und eine Erklärung dafür zu geben versucht, daß der osmotische Druck einer Eiweißlösung schneller als ihre Konzentration steigt. In der zweiten Arbeit: „The osmotic Pressure of cristalline Eggalbumin", ermitteln sie dessen Molekulargewicht zu 43.000. Sie weisen dabei dem Faktor b, dem „spezifischen Wirkungsvolumen" der van der Waalschen Gleichung eine wichtige Rolle zu und halten eine Berechnung mit einer modifizierten van t'Hoff-Gleichung für unmöglich. Die Messungen sind bei 0° mit Kollodiummembranen ausgeführt. Als Gegenflüssigkeit dient eine Mischung von Natriumchlorid- und Natriumbicarbonat-Lösungen. Mit Bezug auf die Forschungen von Sørensen wird gesagt, daß das Ammoniumsulfat einen besonderen Effekt auf die Aktivität der Eialbuminionen "apart from the salting out effect" (über den ihre Ansicht mit der Sørensens konform geht), hat.

In neuerer Zeit haben verschiedene Autoren die Unregelmäßigkeiten der osmotischen Druckkonzentrationskurve durch die Hydratation erklärt und diese rechnerisch zu bestimmen versucht. Kunitz (66) berechnet das Molekular-

gewicht von isoelektrischer Gelatine durch eine modifizierte van t'Hoffsche Gleichung:

$$\mathfrak{P} = \mathfrak{K} \frac{c}{100 - \varphi}$$

$\mathfrak{K} = \frac{\mathfrak{R}\mathfrak{T}}{\mathfrak{M}}$, $\mathfrak{R}$ = die Gaskonstante, $\mathfrak{T}$ = die absolute Temperatur, $\mathfrak{M}$ = Molekulargewicht, c = Gelöstes in gr pro 100 ccm Lösung, φ = Volumen des hydratisierten Stoffes. φ wird aus folgender Gleichung gewonnen:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{1 - 0.5\,\varphi}{(1 - \varphi)^4}$$

η = absolute Viskosität der Lösung η_0 = absolute Viskosität des Lösungsmittels.

Der nach der Kunitz schen Formel korrigierte osmotische Druck ist in einem Konzentrationsbereich von 1—10 und bei verschiedenen Temperaturen proportional der Konzentration. Das Molekulargewicht von Gelatine wurde von Kunitz für einen Konzentrationsbereich 1—8 bei 37° zu 81.500 festgestellt.

Ganz im Gegensatz dazu erklären Fodor und Frankel das Verhalten der Druckkonzentrationskurve von Gelatine. Fodor (32a) kommt auf Grund von Fermentmethoden zur Annahme eines „hochmolekularen Gelatine-Assoziats", das aus locker zusammengehaltenen Komplexen besteht. die ihrerseits wieder stabiler sind. Ihre (d. h. der Komplexe) vermutliche Molekulargröße wird durch osmotische Messungen an Gelatineabbauprodukten, durch Fermentmethoden und durch Methoden zur Feststellung des Mindestmolekulargewichts einzelner Abbauprodukte berechnet. Die einzelnen Komplexe können durch Wärmebehandlung reversibel von einander getrennt werden. Je 17—18 „hochmolekulare Gelatineassoziate" sind durch zwischenmolekulare Kräfte (Massenwirkung, van der Waalsche Kräfte) zu einer Gelatinemizelle vereinigt. Durch osmotische Messungen (Frankel 33a) wird die Größe dieser Mizelle zu 66.000—26.700 (je nach Temperatur und Vorbehandlung durch Lagern im Brutschrank) festgelegt. Die Molekulargewichte werden umso niedriger, je länger die Vorbehandlung und je höher die Temperatur war.

Die Unterschiede des osmotischen Drucks werden durch die Lösung der zwischenmolekularen Kräfte und dadurch der Verkleinerung der Eiweißteilchen in der Hitze erklärt. Die Lösung der zwischenmolekularen Kräfte bedingt auch die Viskositätserniedrigung, das höhere Durchdringungsvermögen gegenüber Ultrafiltern u.s.f. bei langdauernder Brutschrankbehandlung der Gelatine. Durch Analysen wird festgestellt, daß es sich um keine chemische Veränderung handeln kann. Zur Ausführung der Messungen werden Kollodiumhülsen nach Sørensen benützt, die Außenflüssigkeit ist so reichlich, daß eine ungleiche Salzverteilung nach Donnan unberücksichtigt bleibt. Zur Verhinderung der Fäulnis dient Toluol. Das Molekulargewicht wurde nach der van t'Hoffschen Gleichung berechnet. In darauffolgenden Bemerkungen hiezu diskutierten Eggert und Bincer (29a, b) einerseits und Frankel (33b) andererseits die Wirkung der Solvatation, die unter Umständen mit Aggregation und Desaggregation konform geht.

Zwar ohne eigene praktische Messungen des osmotischen Druckes, aber die Messungen anderer neu berechnend sind einige Versuche, die auf Grund von gewissen Formeln, die die Solvatation berücksichtigen, eine genauere Einsicht in die molekularen Größenverhältnisse von hochmolekularen Naturstoffen zu finden suchen. Es wird darin postuliert, daß die Solvatation, d. h. die gebundene Menge Lösungsmittel pro Lösungseinheit sich mit der Konzentration ändert.

Wo. Ostwald (84a) hat vor längerer Zeit eine solche Methode ausgearbeitet und sie 1929 wieder neu aufgegriffen. Er ging von der Annahme aus, daß bei Osmose von sehr vielen Stoffen in verdünnten Lösungen nicht nur ein osmotischer Druck, sondern auch ein Quellungsdruck beteiligt ist. In einer späteren Arbeit (84a) wird darauf hingewiesen, daß bei den Messungen und Berechnungen eine Anziehung der Kolloidteilchen infolge Massenwirkung nach Smoluchowsky deshalb nicht in Frage kommt, weil der genannte Effekt nur bei sehr großer Annäherung der Teilchen in Frage kommt. Da nach Freundlich und Posnjak (34):

$$\mathfrak{P}_{\text{Quellung}} = k\, c^{u},$$

wobei c = gr Quellkörper in Volumeneinheit Quellungsflüssigkeit, k und u = Körperkonstanten, so ist nach Ostwald der osmotische Druck

$$\mathfrak{P}_o = ac + kc^{u}, \quad \text{wobei } a = \frac{\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}}{\mathfrak{M}}.$$

Die Berechnung gestaltet sich in praxi wie folgt: zuerst wird $\frac{\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}}{\mathfrak{M}} = a$ festgestellt, indem $\frac{\mathfrak{P}}{c}$ auf $c = 0$ extrapoliert wird, da

$$\lim_{c=0} \frac{\mathfrak{P}}{c} = \frac{\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}}{\mathfrak{M}}.$$

Nun formt man die Ausgangsgleichung um in:

$$\frac{\mathfrak{P}}{c} - a = b\, c^{n-1};$$

b und n ist dann leicht graphisch zu ermitteln, da man ja die linke Gleichungsseite kennt und eine Kurve für verschiedene Konzentrationen anfertigen kann.

Ermittelt man z. B. bei einer, nach Frankel (s. oben) thermisch vorbehandelten und bei einer unvorbehandelten Gelatineprobe die Konstanten a und b nach Ostwald, so kann entschieden werden, ob die Änderung des osmotischen Druckes einer Solvationsänderung zu verdanken ist (wenn sich nämlich die Faktoren b oder n erhöht haben) oder ob tatsächlich eine Änderung des Aggregationszustandes vorliegt. Wenn freilich das Molekulargewicht mit der Konzentration durch Aggregation wächst, so ergibt sich aus dem Limeswert $\lim_{c=0} \frac{\mathfrak{P}}{c} = (\mathfrak{R}\mathfrak{T})\frac{1}{\mathfrak{M}}$ das kleinstmögliche Mizellargewicht oder das Durchschnittsgewicht der Komponenten, aus denen sich die Mizelle aufbaut. Leider waren in der Frankelschen Arbeit zu wenig experimentelle Daten angegeben, um die Rechnung nach Ostwald ausführen zu können. (Ihre Leistungsfähigkeit zeigt Ostwald am Kautschuk). Ostwald gibt auch an, daß Hydrosole nur in besonders sorgfältig behandelten Fällen für die Anwendung seiner Gleichung geeignet sind, weil dann außer den sonstigen

Faktoren, die Einfluß auf den osmotischen Druck haben, auch der Einfluß der Elektrolyte auf die Quellung in diesem Fall Berücksichtigung finden muß. Trotzdem führt Ostwald Berechnungen nach den Messungen von Kunitz an Gelatine und insbesondere von Adair an Hämoglobin aus, da ihm beide Versuchsreihen genau genug zu sein scheinen. Der Vorteil der neuen Betrachtungsweise zeigt sich darin, daß in die Druck-Konzentrationsgleichung ein Faktor eingeht, der mit der Konzentration variiert und der sich auch bei großen Konzentrationsänderungen als annehmbar erweist, da die Gleichung mit Einbezug der beiden Grenzfälle Quellung und wahre Lösung aufgestellt ist.

In einer zweiten Arbeit wird dieselbe Gleichung von Ostwald nochmals eingehend behandelt. Auch gewisse Diffusionsanomalien werden durch Annahme eines Solvatations(Quellungs-)Druckes zu erklären versucht. Die Theorie zu dieser Ostwaldschen Gleichung ist von W. Haller (42a, b) aufgestellt worden. Thermodynamisch ergibt sich aus der Beziehung von J. J. van Laar, G. N. Lewis:

$$P = \frac{R T}{v_0} \ln (1 - c_m)$$

(v_0 = Molekularvolumen des Lösungsmittels bei normalem Druck, c_m = Molverhältnis, Mol Gelöstes / Mol Gelöstes + Mol Lösungsmittel).
Durch Reihenentwicklung:

$$P = \frac{R T}{v_0} (c_m + {}^1/_2\, c^2_m + {}^1/_3\, c^3_m \ldots .)$$
$$P = k_1 c + k_2 c^2 + k_3 c^3 + \ldots . .$$

Die Ostwaldsche Solvatationsgleichung lautet:

$$P = k'_1 c + k'_2 c^2 !$$

Von der Beachtung der Solvatation geht auch G. V. Schulz (98a, b) aus, der aber die Solvatationswirkung auf den osmotischen Druck ganz anders, nämlich als Volumenfaktor erklärt. Wendet man bei osmotischem Druck von Lösungen die vereinfachte van der Waalsche (nach Wo. Ostwald, Buddesche) Gleichung an:

$$P = \frac{n R T}{V - b},$$

so ist b analog dem Raum, den das Gelöste plus Hydrathülle einnimmt. Die van der Waalssche Volumenkorrektur b zeigt bei kolloiden Lösungen eine Konzentrationsabhängigkeit, indem sie meist schwächer als linear mit mit der Konzentration ansteigt. Dies deutet darauf hin, daß das „spezifische Kovolumen" d. h. das Volumen, das 1 gr der gelösten Substanz plus dem von ihr gebundenen Lösungsmittel in der Lösung beansprucht, (das manchmal 100 mal größer als das spezifische Volumen der trockenen Substanz ist), mit wachsender Konzentration abnimmt und zwar ist der osmotische Druck der Gesamtlösung die Ursache für die Solvatationsänderung eines einzelnen Teilchens. Wenn man dieses für sich allein betrachtet, so wirken auf ein Teilchen zwei Kräfte: der osmotische Druck, der ihm Lösungsmittel entziehen möchte und der „Solvatationsdruck" (analog dem Quellungsdruck), der es mit einer großen Solvathülle zu umgeben trachtet. Zwischen beiden herrscht

das sog. „Solvatationsgleichgewicht". Das Molekulargewicht wird auch hier, wie bei Ostwald als Limeswert errechnet und dann aus der Gleichung:

$$\mathfrak{P}_0 (1 - cS) = \frac{\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}}{\mathfrak{M}} c,\ S \text{ berechnet.}$$

(b = α gS und S = α s; α ist eine Konstante, s ist das spezifische Kovolumen in Litern und S das „wirksame spez. Kovolumen", das eingeführt ist, um α übergehen zu können).

Es zeigt sich, daß „das wirksame spez. Kovolumen" (also auch die Solvatation) erst sehr steil, dann schwächer abfällt, ohne daß man einen Konvergenzwert ohne weiteres angeben könnte. Die Rechnung wird bei Kautschuk, Nitrozellulose und Gelatine (Kunitz) ausgeführt.

Besteht ein Solvatationsgleichgewicht*, so ist der osmotische Druck gleich dem Solvatationsdruck

$$\mathfrak{P}_0 = \mathfrak{P}_s$$

und es sei $\mathfrak{P}_s = f\left(\frac{1}{s}\right)$ wobei $\frac{1}{s}$ = Konzentration der gelösten Substanz in der dispersen Phase ist.

Nach Freundlich und Posnjak ist der Quellungsdruck eines Gels:

$$\mathfrak{P}_Q = k\, c^{\nu}$$

wobei c die Konzentration der Substanz im Quellungsvolumen ist und k und ν Stoffkonstanten sind. Gilt nun für die Quellung und für die Solvatation das gleiche Gesetz, so ist:

$$\mathfrak{P}_s = k\left(\frac{1}{s}\right) = ks^{-\nu}$$

$$\text{Da } \mathfrak{P}_s = \mathfrak{P}_0,\ (\mathfrak{P}_0 = \text{osmotischer Druck})$$

$$\text{so ist } \mathfrak{P}_0 = k\, s^{-\nu}$$

$$\text{oder } \log \mathfrak{P}_0 = -\nu \log s + \log k.$$

Wenn nicht s, sondern S, das wirksame spez. Kovolumen aus der obigen Formel ermittelt wird, so ist

$$\mathfrak{P}_0 = k\alpha^{\nu} s^{-\nu} = k' s^{-\nu}$$

oder in anderer Form, die sich zur graphischen Darstellung besser eignet:

$$\log \mathfrak{P}_0 = \log k' - \nu \log S.$$

Trägt man im Koordinatensystem auf einer Achse log $\mathfrak{P}_0$, auf der anderen log S auf, so erhält man für verschiedene Drucke eine Gerade, was

---

*) Der Autor sagt darüber: „befindet sich ein (einzelnes Kolloid-) Teilchen in einer praktisch unendlich großen Menge von Lösungsmitteln, so wird es sich bis zur Sättigung solvatisieren . . . Lösen wir jetzt in diesem Lösungsmittel eine weitere Substanz auf, so entsteht in ihm ein osmotischer Druck. Das Teilchen . . . ist von einer lösenden Phase umgeben, die unter Leistung von Arbeit Lösungsmittel an sich zieht . . . Zwischen dem osmotischen Druck der lösenden Phase und dem Sättigungszustand der Teilchen wird sich schließlich ein Gleichgewichtszustand einstellen. In diesem werden sich innere und äußere Kraft die Waage halten. Die äußere ist durch den osmotischen Druck bestimmt".

beweist, daß die Werte von S der Solvatationsgleichung folgen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der log P_o-Achse ist gleich dem Logarithmus der Konstanten k'.

Bei Molekulargewichtsbestimmungen und bei der weiteren Anwendung der Solvatationsgleichung muß natürlich ebenso wie bei der Ostwaldschen, das Donnansche Membrangleichgewicht in Rechnung gezogen werden. Der große Vorteil ist auch bei dieser Gleichung, daß mit ihrer Hilfe entschieden werden kann, ob Veränderungen des osmotischen Druckes von kolloiden Lösungen auf Änderung der Solvatation oder Veränderungen der Aggregation beruhen, wie es in der dritten Arbeit von Schulz (98c) an Hand von Beispielen gezeigt wird. Vom thermodynamischen Standpunkt aus unterbaut Schulz seine Ausführungen in einer Arbeit „Zur Thermodynamik des Solvatationsgleichgewichts in kolloiden Lösungen" (98d). In der dritten Arbeit verknüpft Schulz seine Solvatationsgleichung mit der Viskositätsformel von Eisenschitz und wird dadurch in den Stand gesetzt, Schlüsse über Größe und Form der Kolloidteilchen zu ziehen. Da die Formel von Eisenschitz Viskosität eines Sols, Volumenanteil der dispersen Phase und das Achsenverhältnis der Teilchen mit einander verknüpft, kann man durch Viskositäts- und osmotische Druckmessungen die absoluten Dimensionen eines Teilchens ermitteln, wenn das osmotisch gemessene Solvatationsvolumen mit dem viskosimetrisch ermittelten Volumen der dispersen Phase tatsächlich übereinstimmt. Die Richtigkeit der letzten Annahme wird durch röntgenographische Messungen an Hochpolymeren auf folgende Weise bewiesen:

$$\eta_{sp} = \frac{1{,}15}{\pi} \frac{v}{V} \frac{1}{d\, l\, n \frac{2l}{d}}$$

(Formel von Eisenschitz, nur für geringe Konzentrationen gültig)

η_{sp} (spez. Viskosität = η_{rel} (rel. Viskosität) — l (v = Volumen der dispersen Phase, V = Gesamtvolumen, l ist die lange, d die kurze Teilchenachse),

$$\frac{v}{V} = c\, s;$$

$$\eta_{sp} = 0{,}159\; c\; s \frac{1}{d \log \frac{2l}{d}}$$

Von den Unbekannten ist l in Fadenmolekülen (Staudinger):

$l = l' \frac{M}{M'}$, wobei l' und M' die Länge und das Molekulargewicht des Grundmoleküls sind, aus denen sich das Fadenmolekül aufbaut, l' wird aus Röntgendaten gewonnen, M' ist bekannt, da das Grundmolekül wohldefiniert ist, d kann aus l, der Loschmidtschen Zahl und dem aus osmotischen Messungen bekannten Molekulargewicht des Fadenmoleküls gewonnen werden. Wird dann η richtig experimentell bestimmt, so ist dies ein Beweis, daß die Solvatationsvolumina bei der Osmometrie und bei der Viskosimetrie gleich sind. Dies ist tatsächlich der Fall und man kann nun unbedenklich für Moleküle, bei denen d und s nicht bekannt sind, aus der Viskosität und dem osmometrisch ermittelten spezifischen Kovolumen die absoluten Dimensionen von Kolloidteilchen bestimmen. Für Gelatine schätzt Schulz aus

den Größenverhältnissen des Moleküls für eine Mizelle 2—3 Hauptvalenzketten, die parallel ohne große Zwischenräume an einander liegen.

Über Teilchengewichte von Muskeleiweißkörpern ist eine Arbeit von R. Stöver (unter H. Weber) (103) erschienen. Auch er betont die außerordentliche Wichtigkeit des spezifischen Wirkungsvolumens der Eiweißkörper für die Berechnung des Molekulargewichts aus osmotischen Messungen. Es kann aus Messungen des osmotischen Drucks bei verschiedenen Konzentrationen ermittelt werden. Die Druck-Konzentrationskurve des Myogens folgt genau der van der Waalsschen Gleichung, wenn sein Molekulargewicht zu 81.000 angenommen wird. Im übrigen glaubt Stöver sagen zu können, daß die „Lösungsaggregate von Myogen kugelförmig sind, da das van der Waalssche Volumen und das aus der Einsteinschen Viskositätsformel errechnete Volumen gleich groß sind. „Einsteins Viskositätsformel gilt aber nur für kugelförmige Teilchen, ergo müssen die Myogenpartikel kugelförmig sein. Die Messungen sind bei 2° und 4° ausgeführt und außerdem um die Fäulnis mit Sicherheit hintanzuhalten, sind die benützten Flüssigkeiten reichlich mit Toluol versetzt. Die Manometerflüssigkeit besteht aus Paraffinöl, das direkt über die Eiweißlösung geschichtet ist. Nur bei ganz hohen Drucken wurde Quecksilber als Manometerflüssigkeit verwendet. Als Membran diente ein Kollodiumhäutchen. Es wurde Wert darauf gelegt, daß die Salzverteilung in der Innen- und Außenflüssigkeit gleich war, sodaß Donnankorrekturen nicht gemacht werden mußten, jedoch wurden noch einige Versuche unter Zugabe von konzentrierter Harnstofflösung gemacht. Es ist dies ein Verfahren, das von einer Gruppe von neueren Untersuchern angewandt wurde und das verblüffende Resultate zeitigte. In diesem Falle wurde bei einer Harnstoffkonzentration von 36—45% und einer Myogenkonzentration von 2% ein Teilchengewicht von 33.000 für das Myogen errechnet, wenn die van t'Hoffsche Formel verwandt wurde, ein Teilchengewicht von 34.000, wenn das, aus den früheren Versuchen erhaltene, van der Waalssche Wirkungsvolumen mit einbezogen wurde. In konzentrierter Ammoniumrhodanidlösung wurde das Teilchengewicht dagegen unerwarteterweise auf 337.000 bis 254.000 erhöht gefunden, trotzdem Rhodanid ebenso wie Harnstoff die Löslichkeit der Eiweißkörper stark erhöht.

Für Myosin, den Eiweißkörper, der im Muskel meist als Gel vorhanden ist, wurde für 1,02%ige Lösung (das Myosin ist sehr schlecht löslich) ohne Berücksichtigung des van der Waalsschen Wirkungsvolumens ein Molekulargewicht von ungefähr 1.270.000, bei Einengen auf 1,44%ige Lösung ein solches von 526.000 gefunden, jedoch bemerkt der Verfasser, daß sich beim Einengen ein teilweiser Abbau des empfindlichen Stoffes vollzogen haben könne. In 45%iger Harnstofflösung steigt der osmotische Druck ebenfalls an, sodaß ein ungefähres Teilchengewicht von 100.000 resultiert.

Die Messung des osmotischen Drucks von Eiweißlösungen in hochkonzentrierter Harnstofflösung ist besonders von den beiden Amerikanern N. F. Burk und D. M. Greenberg ausgebaut worden. Außer einer vorläufigen Mitteilung (18a) gelangten 2 größere Arbeiten (18b, c) von ihnen zur Veröffentlichung. Der Grund zu den Versuchen, Druckbestimmungen in Harnstofflösungen zu machen, war: „1.) Eine Methode der Molekulargewichts-

bestimmung für Eiweißkörper zu entwickeln, die am isoelektrischen Punkt nicht wasserlöslich sind,

2.) zu ermitteln, ob Eiweißkörper Änderungen des Aggregationszustandes mit dem Wechsel des Lösungsmittels zeigen". (Burk und Greenberg).

Da sich Eiweißkörper in Harnstofflösungen (ebenso wie in zahlreichen anderen organischen Stoffen) sehr gut lösen und eine Salzbildung nicht in Frage kommt, wurde als Standardlösung reine, 6,66 molare Harnstofflösung gewählt. Als Membran dienten Kollodiumzylinder. Das Diffusionsgleichgewicht wurde bei dauerndem Bewegen der Apparatur und 0° meist in weniger als 2 Wochen erreicht. Als erstes Versuchsmaterial wurde Kasein (hergestellt nach der Methode von van Slyke-Baker in der Abwandlung von Greenberg und Schmidt) verwandt. Die Konzentration aller Eiweißkörper wurde kolorimetrisch bestimmt. Für 1% Kasein wurde in der Veröffentchung in 1—3%iger Lösung ca. 16 cm Wasserdruck gefunden. Es zeigte sich dann aber, daß die Messungen nicht am isoelektrischen Punkt des Kaseins durchgeführt worden waren, da Zusatz von Kaliumchlorid zur Lösung den osmotischen Druck erniedrigte, der isoelektrische Punkt aber als Punkt des niedrigsten osmotischen Drucks definiert ist. Darum wurden den Harnstofflösungen generell Pufferlösungen zugesetzt. Die Puffer wirken allerdings in Harnstofflösung anders als in Wasser durch die Aktivitätsänderung der Ionen. Eben deswegen war auch die Stelle des niedrigsten osmotischen Druckes des Eiweißes in Harnstofflösung bei einer ganz anderen Wasserstoffionenkonzentration wie in Wasser.

Auch in den Harnstofflösungen zeigt sich ein stärkeres als proportionales Anwachsen des osmotischen Druckes mit der Konzentration. Nicht nur die Solvatation ist dafür nach Burk und Greenberg verantwortlich zu machen, sondern auch die Abweichungen von den Gesetzen für die idealen Lösungen. Man erhält aber eine Gerade als Druck-Konzentrationskurve, wenn man die Konzentration aus der Gleichung

$$\mathfrak{P} = k \frac{100\ \mathfrak{C}'}{100 - h\mathfrak{C}'} \quad (1)$$ ermittelt.

($\mathfrak{P}$ = osmotischer Druck, $\mathfrak{C}'$ = Konzentration als Trockengewicht von Kasein pro 100 gr Lösungsmittel, k und h sind Konstanten, wobei k nicht mit RT identisch sein soll).

Falls nun die Solvatation oder ein anderer Einfluß, der sich nicht mit der Konzentration ändert, die Drucksteigerung bewirkt, so erscheint

$$\mathfrak{P} = k\ \mathfrak{C} \quad (2)$$

wobei $\mathfrak{C}$ die „thermodynamische Konzentration", in die Menge des gebundenen Lösungsmittels mit einbezogen ist.

h sei die Gewichtsmenge Lösungsmittel, die von 1 gr Protein gebunden ist. Dann ist 100—h $\mathfrak{C}'$ das Gewicht des freien Lösungsmittels pro 100 gr. Lösung und

$$\mathfrak{C} = \frac{100\ \mathfrak{C}'}{100 - h\mathfrak{C}'} \quad (3)$$

Bei Druckmessung bei verschiedener Konzentration kann aus $\frac{P}{C'}$, $\frac{P}{C}$ berechnet werden. $\frac{P}{C}$ erweist sich dann als konstant. Das Molekulargewicht kann für die korrigierte Konzentration aus der thermodynamischen Formel berechnet werden, die von Burk und Greenberg angegeben wird:

$$P = \frac{c\, d\, R\, T}{100\, M} \quad (4)$$

(wobei d = spezifisches Gewicht des Lösungsmittels).

Wird bei den Adairschen Versuchen ebenfalls die Konzentration als gr pro 100 gr Lösungsmittel statt pro 100 gr Lösung angegeben, so kann nach Burk und Greenberg erreicht werden, daß eine für den ganzen Konzentrationsbereich geltende Solvatationskonstante verwendet werden kann, oder daß die Gleichung von Adair von 0—5% ihren Wirkungsbereich auf 0—30% ausdehnt. Auch bei den Werten von Kunitz kann auf diese Weise $\frac{P}{C}$ konstant gemacht werden. h braucht nicht unbedingt als Solvatationskonstante, sondern kann auch als empirischer Wert aufgefaßt werden. Die abgeleitete Formel behält dabei aber trotzdem ihre Tragweite. So ist bei nichtisoelektrischem Kasein in Harnstofflösung die Abweichung der Druck-Konzentrationskurve von der Geraden viel größer als am isoelektrischen Punkt (es wird angenommen, daß infolge der Ladung die Solvatation auch größer wird), sie kann aber auch hier völlig befriedigend korrigiert werden, da die Theorie der Membrangleichgewichte bei steigender Konzentration ein Membranpotential, also einen stärker als proportional mit der Konzentration steigenden osmotischen Druck ergibt.

Als Molekulargewicht ergibt sich schließlich für Kasein 33.600 ± 250. Es hat allerdings den Anschein, daß es sich nur um den Durchschnitt aus dem Gewicht verschieden schwerer Kaseinfraktionen handelt.

Durch Elektrodialyse gereinigtes Hämoglobin (dessen Reinheit durch Leitfähigkeitsmessungen geprüft wird) ergibt in Harnstofflösung ein Molekulargewicht von 34.300 ± 425, in 6,5 molarer, phosphatgepufferter Glycerinlösung ergibt sich ein Molekulargewicht von 66.500, also durchaus analog den übrigen Untersuchungen. Das Ergebnis in Harnstofflösung wird von den Autoren dadurch erklärt, daß sie nach Erreichung des Diffusionsgleichgewichts durch Verdünnung der Lösung eine sofortige und vollständige Präzipitation herbeiführen konnten. Schon früher ist nachgewiesen worden (Anson und Mirsky), daß Hämoglobin in Harnstoff denaturiert wird. Sein Spektrum ist das gleiche wie das des Kathämoglobins, welches wiederum mit denaturiertem Methämoglobin identisch zu sein scheint. Durch die Denaturierung kann eine Hydrolyse und Aufspaltung je eines Moleküls in 2 andere eingetreten sein. Daher würde sich nur das halbe Molekulargewicht für das Hämoglobin ergeben.

Auch für Edestin zeigt sich ein außerordentlich interessantes Ergebnis. Das Molekulargewicht in Harnstofflösung beträgt nämlich 49.500 ± 700, während Svedberg in 0,8—1 molarer Chlornatriumlösung einen homomolekularen Stoff vom Molekulargewicht 212.000 ± 10.000 eruiert, also von einem Gewicht, das viermal so viel beträgt.

Eieralbumin ergab in Harnstofflösung, trotzdem es denaturiert wurde, fast dasselbe Molekulargewicht wie in Wasser, nämlich 36.100 und 35.800. In einer gepufferten, wässrigen Lösung ohne Harnstoffzusatz ergab sich bei einer Bestimmung 35.000.

Eine eigene Arbeit gilt dem osmotischen Druck, dem Molekulargewicht und der Stabilität des Serumalbumins. Versuchsmaterial ist 1 mal kristallisiertes und elektrodialysiertes Pferdeserumalbumin. In wässriger Lösung ohne Harnstoffzusatz ergab sich bei $P_H = 4{,}8$ ein Durchschnittsmolekulargewicht von 74.600 (aus Werten von 72.400—76.00). Dies stimmt gut zu den Werten von 72.000 $\pm$ 3000, die Adair und Robinson erhielten.

Bei der Messung des osmotischen Druckes in Ammoniumsulfatlösung stellt sich eine Schwierigkeit heraus, als $\frac{P}{C}$ bei Anwendung eines konstanten h nicht konstant bleibt. h (die Solvatationskonstante) nimmt mit zunehmender Konzentration ab. Bei Anwendung einer ähnlichen Gleichung wie Wo. Ostwald gelangen die Verfasser zu einem Durchschnittsmolekulargewicht von 76.400 von Serumalbumin in Ammoniumsulfatlösung. Zwei Bestimmungen in 76%iger, acetatgepufferter Glycerinlösung ergeben 74.700 (berechnet nach der van t'Hoffschen Formel).

In Harnstofflösung wird Serumalbumin nicht sofort denaturiert. Daher wurde die Eiweiß-Harnstofflösung zehn Tage vor Zusammensetzung der Apparatur angesetzt. Bei der Berechnung wurde wieder ein konzentrationsabhängiges h angenommen. Es ergab sich für Konzentrationen von 0—10 ein mittleres Molekulargewicht von 73.800.

Zu gleicher Zeit wie Burk und Greenberg stellten auch Huang und Wu ihre Versuche an, die zu dem Zwecke unternommen wurden, zu erkennen, welchen Einfluß die Denaturierung auf die Teilchengröße habe. Als Lösungsmittel wurde 40—50%ige Harnstofflösung benützt. Das osmotische Gleichgewicht wurde jeweils 5 Tage gehalten, bevor die Messungen als endgültig anerkannt wurden. Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte nach dem van t'Hoffschen Gesetz. Das Versuchsmaterial war 2—3 mal kristallisiertes Eieralbumin. Bei Denaturierung durch Harnstofflösung und durch Alkohol fand sich ein Molekulargewicht von 32.500 $\pm$ 2.300, also kein Unterschied zu nativem Eieralbumin. Bei, durch Alkali bzw. Säure denaturiertem und dann neutralisiertem Eieralbumin fand sich ein kleineres bzw. größeres Molekulargewicht. Auch an Methämoglobin wurden in konzentrierten Harnstofflösungen Berechnungen des Molekulargewichts vorgenommen, die ungefähr dasselbe Ergebnis, wie es Adair an nativem Hämoglobin fand, zeitigten: 66.200 $\pm$ 4.200.

IV. Freie Diffusion.

Da nach den Feststellungen A. Einsteins (28) die Brownsche Bewegung die Ursache für den osmotischen Druck und auch die freie Diffusion ist, wurde von verschiedenen Seiten der Diffusionskoeffizient der Eiweißkörper für die Feststellung ihres Molekulargewichts auszunützen versucht. Ein Hauptbeweggrund für diese Versuche bildete die Annahme, daß die niedermolekularen Beimengungen der Eiweißkörper bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nicht stören würden wie sie es bei der Gefrierpunktserniedrigung und der Osmometrie in erheblichem Maße tun.

Schon Th. Graham (40) hat in seinen Abhandlungen über die Dialyse vorgeschlagen, Stoffe verschiedenen Molekulargewichts durch freie Diffusion zu trennen. Auch dies bildet einen Hauptpunkt, der für das Verfahren der freien Diffusion sprechen sollte, da man Kolloide mit verschiedenem Molekulargewicht auf diese Weise voneinander trennen kann. Graham stellt fest, wieviel von den Stoffen mit den zu bestimmenden Molekulargewichten in gleichen Zeiten in einem Glasgefäß, das mit wässriger Lösung gefüllt ist, nach oben diffundiert. Er vergleicht Stoffe mit verschiedenen Molekulargewichten miteinander und kommt dann zu dem Ergebnis, daß Stoffe mit höherem Molekulargewicht sehr viel langsamer diffundieren. Quantitative Schlüsse auf die Molekulargröße hat Graham nicht gezogen.

Svante Arrhenius (6) regte an, daß man Toxine voneinander trennen möge, indem man sie in Gelatinezylindern diffundieren läßt. Die Stoffe mit dem niedrigeren Molekulargewicht würden dann rascher nach oben diffundieren. Quantitative Schlüsse auf das Molekulargewicht wurden auch hier nicht gezogen.

Einen interessanten Versuch unternahm Dabrowsky (24), der davon ausging, die einzelnen Mizellen eines Kolloids durch Diffusion zu „fraktionieren". Je größer die Einzelteilchen sind, desto langsamer diffundieren natürlich die Stoffe. Um Konvektionsströme, die bei langer Versuchsdauer wahrscheinlich auftreten werden, zu vermeiden, wird ein Thermostat benützt und die Diffusion geht in ganz engen Glaszylindern, von denen eine Menge nebeneinander verkittet sind, vor sich. Die Glaszylinder haben einen Durchmesser von ca. 1 mm und sind 40 mm lang. Kittsubstanz ist Zelluloid. Oberhalb und unterhalb der Glasröhrenplatte sind Rührer angebracht, um eine Konzentrationsverarmung auf einer Seite oder eine übermäßige Vergrößerung der Konzentration auf der anderen Seite des Diaphragmas zu vermeiden. Die Versuche wurden mit mehrmals umkristallisiertem Ovalbumin in Ammoniumsulfatlösung durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 3 Monate. Trotz des Thymolzusatzes waren die Lösungen nach Versuchsabschluß leicht gelblich und getrübt. Das Molekulargewicht für Ovalbumin wurde aus den vorliegenden Versuchen nicht errechnet, jedoch wurde mit Hilfe der Einsteinschen Gleichung.

$$K = \frac{R\,T}{N} \; \frac{1}{6\,\pi\,r\,\eta}$$

(K = Diffusionskoeffizient, N = Loschmidtsche Zahl als $70{,}5 \times 10^{22}$ nach Perrin, η = Viskosität),

r, der Radius der Ovalbuminteilchen mit Solvathülle zu 1,37 bestimmt (nach den Versuchen Svedbergs beträgt er 2,17!).

In reinem Wasser ergab sich, wenn man kugelförmige Teilchen annahm, auf welcher Voraussetzung ja die Einsteinsche Gleichung aufgebaut ist, ein 6 mal größeres Volumen der Eiweißteilchen als in Ammoniumsulfatlösung. Dies schrieb Dabrowsky dem Umstand zu, daß die Eiweißteilchen eben 6 mal stärker in reinem Wasser als in Salzlösung solvatisiert sind.

Dabrowsky hält es für möglich, daß während der langen Versuchsdauer Zersetzung der Proteine in niedriger-molekulare Spaltungsprodukte eingetreten war. Um die Versuchsdauer verkürzen zu können, müßte man die Diffusionshöhe verkleinern, riskiert dann aber Konvektionsströme.

Einer der ersten, die das Problem der Diffusion von Kolloiden aufgriffen und der es an vielen Eiweißkörpern und zahlreichen Fermenten und organischen Farbstoffen studierte, war R. O. Herzog. Er benützte die Apparatur von Oeholm, d. i. ein Diffusionszylinder, in dem die zu diffundierende Lösung vorsichtig unterschichtet werden kann und dann durch Abzapfen unten 4 einzelne Schichten gewonnen werden können. Zur Verhinderung der Fäulnis diente wieder Toluol, Versuchsdauer war 45—68 Tage, Versuchsobjekte waren Ovalbumin, Ovomucoid und Clupeinsulfat außer vielen Fermenten. In seiner ersten Veröffentlichung schätzt Herzog (46a) das Molekulargewicht von Ovalbumin auf ca. 20.000. Unter Benützung einer Gleichung von Thovert

$$M = \frac{59{,}2}{K^2}$$

(M = Molekulargewicht, K = Diffusionskoeffizient) wird das Molekulargewicht später (50) noch zu 7000 für Ovalbumin und zu 30.000 für Ovomucoid verbessert. In einer dritten Arbeit (46b) wurde zur Berechnung des Molekulargewichts die Einsteinsche Gleichung verwandt und man erhält dann für das Molekulargewicht des Ovalbumins (unter Benützung der alten Versuchsdaten) 73.000. Noch später wird dann dieser Wert durch Korrektur der Berechnung zu 80.000 angenommen.

Schon aus diesen, zwischen 17.000 und 73.000 schwankenden Größen kann man ersehen, wie unsicher die Berechnung des Molekulargewichts nach dem Diffusionskoeffizienten ist. Herzogs Schüler, D. Krüger und H. Grunsky (65) kommen demgemäß auch zu der Folgerung, daß ein Schluß von der Größe des Diffussionskoeffizienten auf die Teilchengröße nicht möglich sei. Sie schließen dies daraus, daß sich dem Diffusionsvorgang andere Vorgänge wie Solvatation, Mizellteilung u.s.f. überlagern und daß deshalb der Diffusionskoeffizient konzentrationsabhängig sei. Es darf daher nicht nach dem Fickschen Gesetz $dA = -\,k\,q\,\frac{dc}{dx}\,dt$

(dS = Stoffmenge, die in der Zeit dt durch den Querschnitt q des Diffusionszylinders wandert, wenn an der Stelle x das Konzentrationsgefälle

$\frac{dc}{dx}$ besteht, k = Diffusionskoeffizient) sondern es muß nach dem Boltzmannschen Gesetz gerechnet werden:

$$k = \frac{1}{z + \frac{dc}{dx} \int_x^\infty \frac{dc}{dx} \, x \, dx}$$

(k, der Diffusionskoeffizient ist dabei eine Funktion von x, der Entfernung von der ursprünglichen Trennungsfläche, c = Konzentration).

Nachdem, wie wir gesehen haben, die Oeholmsche Methode der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wegfällt, verbleiben noch einige andere Methoden, die zum größten Teil ähnlich der Dabrowskis sind. Vor allem ist dabei die Bestimmung des Molekulargewichts aus dem Dialysenkoeffizienten zu nennen. Obwohl die Untersucher Brintzinger und Mitarbeiter (14, 15, 16a , b) keine Versuche am Eiweiß angestellt haben, scheint mir doch das Verfahren einen gangbaren Weg, der vielleicht zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine führen könnte, darzustellen, insbesondere da die Autoren vielversprechende Versuche über die Verkleinerung der Teilchen beim enzymatischen Stärkeabbau angestellt haben.

Die Methode geht davon aus, daß die Dialyse (oder besser Filtration) von den zu untersuchenden Stoffen nach dem Abklingungsgesetz vor sich geht:

$$c_t = c_0 \, e^{-\lambda t}.$$

(e = Basis des ln, c_0 = ursprüngliche Konzentration, c_t = augenblickliche Konzentration, t = Zeit seit Versuchsbeginn, λ = Dialysenkoeffizient, eine Konstante, die abhängig ist von der Temperatur, der Membran, der Gegenwart anderer Stoffe u. a.).

Der Dialysenkoeffizient wird durch das Verhältnis $\frac{\log c_t}{t}$ bestimmt. Dieses Verhältnis wird graphisch durch eine Gerade dargestellt, solange gleich große Teilchen in der zu untersuchenden Substanz vorliegen. Es ist eine nach oben gekrümmte Kurve, wenn die Teilchen ungleich groß sind. Der Zusammenhang zwischen dem Teilchengewicht und dem Dialysenkoeffizienten wird durch die Gleichung dargestellt:

$$\lambda \sqrt{M} = \text{Konstant}.$$

Vorteile bietet dieses Verfahren im wesentlichen dadurch, daß die Versuchsdauer auf wenige Stunden verkürzt ist (daher auch keine Alterung der Lösung eintreten kann) und daß Konvektionsströme ganz bestimmt nicht auftreten können. Allerdings darf in den zu untersuchenden Lösungen keine Dissoziation eintreten und man weiß auch nicht, wie sich der erwähnte Zusammenhang zwischen Dialysenkoeffizient und Teilchengewicht bei solchen Größen, wie sie das Molekulargewicht der Eiweißkörper darstellt, verhält.

Mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten, der aber nicht durch freie Diffusion bestimmt wurde, haben J. N. Northorp und M. L. Anson (81) erfolgreich ersucht, das Molekulargewicht des Hämoglobins zu messen. Der Diffusionskoeffizient nach Northorp und Anson ist „die Menge, die

durch eine Einheitsdiffusionsfläche in Einheitszeit bei gleichbleibendem Konzentrationsunterschied diffundiert."

$$\mathfrak{D} = \frac{dQ}{\mathfrak{A} \quad dt \quad \frac{dc}{dx}}$$

(dQ = Hämoglobinmenge, die in der Zeit dt durch die Fläche $\mathfrak{A}$ diffundiert, $\frac{dc}{dx}$ = Konzentrationsunterschied).

Der Konzentrationsunterschied bleibt deshalb gleich groß, weil beidseitig sehr große Flüssigkeitsmengen verwendet werden und die Versuchsdauer relativ kurz angesetzt wird.

Wenn der Diffusionsweg h ist, so ist:

$$Q = \mathfrak{D}\,\mathfrak{A}\,t\,\frac{c_1 - c_2}{h}$$

(Q = diffundierte Hämoglobinmenge, c_1 und c_2 = Konzentration vor und hinter der Membran).

Wenn $c_2 = 0$ ist, dann:

$$\mathfrak{D} = \frac{h}{\mathfrak{A}} \quad \frac{Q}{t\,c_1}$$

Wenn $\frac{h}{\mathfrak{A}} = \mathfrak{K}$ (Apparatkonstante) und $c_1 = 1$ gesetzt wird, so ist:

$$\mathfrak{D} = \frac{\mathfrak{K}\,Q}{t}\,.$$

Der Apparat besitzt als Trennschicht zwischen Hämoglobinlösung und Gegenflüssigkeit Filtrierscheiben aus gepreßtem Jenaer Glaspulver oder Alundumscheiben. Dadurch werden Konvektionsströme vermieden. Innen laufen Rührer, die eine Anreicherung des Hämoglobins in der Gegend der Filtrierscheiben verhindern. Innenflüssigkeit ist 40—50 ccm, mit CO_2 gesättigte Pufferlösung.

Die Apparatur wurde an Salzsäure, Laktose und verschiedenen Salzen erprobt. Mit einem Versuchsmaterial von Kohlenmonoxyd-Ochsenhämoglobin wurde nach der Einsteinschen Gleichung, bei Annahme kugelförmiger Moleküle ein Molekulargewicht von 68.500 ± 1000 gewonnen.

Auch Svedberg (105) geht bei seinen Diffusionsmessungen zur Bestimmung der Teilchengröße von der Einsteinschen Formel aus. Sein Verfahren ist allen bisher erwähnten in Bezug auf Feinheit der Messungen, raschen und störungsfreien Verlauf der Diffusion bei weitem überlegen. Die Diffusionszelle Svedbergs besteht aus Quarzglas und ist schwingungsfrei in einem Thermostaten untergebracht. Sie wird von Quecksilberquarzlampen beleuchtet, sodaß das Eiweiß in dem ultravioletten Licht fluoresziert. Der Fortgang der Diffusion wird photographiert und dann mikrophotometrisch vermessen. Der Diffusionskoeffizient zeigte sich auch hier leider nicht konstant, sodaß keine Schlüsse auf das Molekulargewicht gezogen werden konnten, wie später H. Tiselius und D. Groß (107) feststellten.

In neuester Zeit haben Mc Bain, E. R. Dawson und H. A. Barker (71) bei Ovalbumin ein Molekulargewicht von 34.000 bestimmt,

das mit dem auf anderen Wegen gefundenen genau übereinstimmt. Sicher ist, daß nur im isoelektrischen Punkt des betreffenden Eiweißes gemessen werden darf, da sonst die kleinen Säure- und Hydroxylionen auf die Diffusion der Eiweißionen beschleunigend einwirken.

V. Bestimmung des Aequivalentgewichts und des Mindestmolekulargewichts.

Eine Methode, die allerdings keine sehr übereinstimmenden Resultate liefert, die aber häufig angewandt wurde, ist die, das Säure- und Basenbindungsvermögen des Eiweißes zu bestimmen. Wird ein Gewichtsteil Lauge (bzw. Säure) von 10 Gewichtsteilen Eiweiß aufgenommen, so verhält sich, wenn die Wertigkeit des Eiweißes 1 ist, ein Mdl Lauge zu 1 Mdl Eiweiß wie 1:10. Das Äquivalentgewicht des Eiweißes ist dann Molekulargewicht des Hydroxyl- bzw. Säurerestes mal 10. Kann nun noch die Wertigkeit des Eiweißes bestimmt werden, so müßte man sein Molekulargewicht als Produkt von Äquivalentgewicht und Wertigkeit erhalten. Kann die Wertigkeit des Eiweißes nicht bestimmt werden, so ist sein Molekulargewicht ein einfaches Vielfaches des Äquivalentgewichts.

Von Eiweiß liegen natürlich außerordentlich viele Bestimmungen des Säure- und Basenbindungsvermögens vor. Wie verschieden hoch alle diese Werte sind, kann aus einer Tabelle von M. Spiegel-Adolf (101) über die Äquivalentbestimmungen bei den Globulinen ersehen werden. Es werden darin Werte von 1930, 3000, 5000—10.000 und 14.241 (elektrochemisches Äquivalent) genannt.

Von Kasein sind von 3 Autoren recht übereinstimmende Daten über das Säureäquivalentgewicht vorhanden: nämlich 1145 (Bleyer und Seidl 13), 1143 (Pfyl 89), 1135 von Laqueur und Sackur (67), die eine Basizität von 4—6 annehmen und demgemäß auf ein Molekulargewicht von 6.800 kamen. Nach neueren Bestimmungen ist aber das Molekulargewicht noch sehr viel höher, es hat darum, da Kasein anscheinend eine vielbasige Säure darstellt, die Kenntnis eines Faktors, des Äquivalentgewichts, ohne genaue Kenntnis des anderen Faktors, der Wertigkeit, für die Feststellung des Produkts, des Molekulargewichts, nicht den geringsten Wert.

Gerngroß (39) nahm an, daß es sich bei dem Salzsäurebindungsvermögen der Gelatine wie es Procter (90), Procter und Wilson (91), Wintgen und Krüger (116), Wintgen und Vogel (118) zu 850 gro pro Mol Salzsäure, und Hitchcock (55a, b), Atkin und Douglas (7) zu 1100 gr feststellten, vielleicht um das tatsächliche chemische Molekulargewicht der Gelatine handle, und daß die hohen Zahlen, die bei den anderen Versuchen resultierten, durch Molekülaggregation zu erklären seien. Heute dürfte das Molekulargewicht der Gelatine nicht unter dem zehnfachen Wert angenommen werden.

Zu einem vollständigen Verfahren der Bestimmung des Molekulargewichts der Eiweißkörper gehört aber außer der Äquivalentsgewichtsbestimmung noch die Kenntnis der Wertigkeit. Gerade hier kann eine exakte Festlegung nicht erfolgen. Man bestimmt die Äquivalentleitfähigkeit mit wachsender Ver-

dünnung. Nach der Ostwald-Waldenschen Regel (die aber nur für starke Elektrolyte aufgestellt worden war) (zit. nach Pauli 87) gilt:

$$\lambda_{1024} - \lambda_{32} = n\ x$$

(Wobei λ die Äquivalentleitfähigkeit in den diversen Verdünnungen, n eine Konstante, x die Wertigkeit sind).

Daß man als Quotient aus den osmometrisch festgestellten Molekulargewichten und dem Äquivalentgewicht mehrstellige Wertigkeiten (z. B. 39 bei Ovalbumin), aus der Ostwald-Waldenschen Regel nur einstellige Zahlen (2—5, Laqueur usw.) erhält, kennzeichnet vielleicht am besten den Charakter dieser Berechnungen. Pauli (87b) hebt hervor, daß die Wertigkeit nicht genau bestimmt werden kann, „da man nicht weiß, welchen Anteil die interionischen, elektrostatischen Kohäsionskräfte zwischen Eiweißion und Gegenion an der Herabsetzung der freien Ladung haben".

Ähnliche Versuche, das Verbindungsgewicht von Eiweiß, aber nicht durch die Säure- und Basenbindung zu ermitteln, sind folgende: die eine Überlegung ist von Beth af Ugglas (109) anläßlich eines Artikels über „Eiweißfällung durch Eiweiß" angestellt worden. Er konnte wiederholt einen Hämoglobin-Kaseinniederschlag herstellen, der Hämoglobin zu Kasein immer wie 2:1 enthielt. Jedenfalls, schloß er dann, verhielten sich die Molekulargewichte von Hämoglobin und Kasein wie einfache, kleine Vielfache und da er annahm, daß in dem Niederschlag je 2 Moleküle Hämoglobin mit 1 Molekül Kasein zu einem einzigen Molekül vereinigt seien, und ferner, daß Hämoglobin ein Molekulargewicht von 16.000 habe, so schloß er auf ein ebensolches Molekulargewicht von Kasein. Wenn wir das heute anerkannte Molekulargewicht von Hämoglobin zu Grunde legen, so kommen wir auf ein Molekulargewicht von 68.000.

R. Wintgen und Löwenthal (117) haben Fällungen von Gelatine mit kolloidalen Chromoxydsolen vorgenommen und mit einem Äquivalentaggregatgewicht Chromoxyd, das sie berechneten, stets rund 30.000 gr Gelatine gefällt. Dies ist ein Wert, der gut mit den, durch andere Methoden ermittelten, übereinstimmt.

Unter diesen Versuchen ist auch die Kalkulation, die Hüfner (58a) seinerseits angestellt hat, zu nennen. Er fand, daß immer 16.000 gr Hämoglobin 1 Mol Kohlenoxyd binden und daß Kohlenoxyd- und Sauerstoffmaximalbindung beide gleich groß waren und in stöchiometrischem Verhältnis zum Hämoglobin standen. Er schloß daraus, daß mindestens 1 Mol Kohlenoxyd von 1 Mol Hämoglobin gebunden würde und daß das Molekulargewicht von Hämoglobin deshalb mindestens 16.000 sein müsse. Da in gleichen Hämoglobinmengen immer ein gleicher geringer Prozentgehalt von Eisen vorhanden ist, so kam er aus dem Eisengehalt ebenfalls auf das Molekulargewicht von 16.000, wenn er annahm, daß in 1 Molekül Hämoglobin auch 1 Atom Eisen vorhanden war. Damit wurde erstmalig auf Grund eines in kleiner Menge vorhandenen Molekülbestandteiles auf die Größe des Eiweißmoleküls geschlossen und ein beträchtlicher Wert erreicht.

Die Bestimmung des Minimalmolekulargewichts aus chemischen Bestandteilen des Eiweißes ist dann sehr häufig angewandt worden. Die Formel, nach der das Molekulargewicht berechnet werden kann, ist:

$$\text{Mindestmolekulargewicht} = \frac{100\ n\ A}{x}$$

(n = Anzahl der Säurereste, Atome usw., die im Molekül bestimmt werden. A = Atomgewicht bzw. Verbindungsgewicht der betreffenden Säurereste, Atome usw., x = die Prozentzahl, in der sie im Gesamtstoff vorhanden sind).

Das Mindestmolekulargewicht wird also dann besonders hoch, wenn x möglichst klein und A möglichst groß ist. Ein früher, umfassender Versuch von F. N. Schulz (97) zur Bestimmung von Minimalmolekulargewichten auf Grund verschiedener analytischer Daten sei hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. In neuerer Zeit haben Cohn, Hendry und Prentiß (22) eine Zusammenstellung der möglichen Mindestmolekulargewichte der Eiweißkörper auf Grund von Analysen verschiedener Untersucher gegeben. Als geeignete Stoffe, die zwar in stöchiometrischem Verhältnis, jedoch in sehr geringer Menge im Molekül vorkommen, haben sie je nach der Eiweißart Eisen, Kupfer (bei Hämoglobin der Mollusken und Arthropoden), Schwefel, Schwefelwasserstoff, Phosphor, Troptophan u. a. Aminosäuren angegeben. Man berechnet systematisch zuerst verschiedene Molekulargewichte desselben Eiweißes aus verschiedenen, der oben genannten Komponenten, die in dem Eiweiß vorhanden sind, die aber als nur einmalig im Molekül angenommen werden. Teils decken sich die verschiedenen, so erhaltenen Minimalmolekulargewichte, teils zeigen sie große Unterschiede. Decken sie sich, so ist das Bestätigung und Sicherstellung der erreichten Zahl, weisen sie größere Unterschiede auf, so ist entweder das „wirkliche“ Mindestmolekulargewicht das gemeinsame Vielfache, was darauf hinweist, daß n, die Zahl der Atome der Prüfstoffe vervielfacht werden muß oder aber das eine Mindestmolekulargewicht ist das Vielfache des anderen. Durch Kombination verschiedener Methoden kann man u. U. zu dem, durch osmotische Messungen gesicherten, wahren Molekulargewicht gelangen, wie z. B. bei Eialbumin 33.800 (Sørensen erhielt 34.000) und Serumalbumin, das nach Cohn, Hendry und Prentiß ein Minimalmolekulargewicht von 45.000 zeigt. Nach Sørensen (s. Cohn, Hendry und Prentiß 22, sowie 102b) fällt dieser Wert mit den, von ihm osmometrisch erhaltenen Werten zusammen.

E. Waldschmidt-Leitz, F. Ziegler, A. Schäffer und L. Weil (9a) haben für Clupein ein Minimalmolekulargewicht von 2021 errechnet, ein Wert, der dann von Svedberg durch ultrazentrifugale Messungen bestätigt wurde (zit. nach Pauli 87b). Für Salmin errechneten sie ein Mindestmolekulargewicht von 2855.

VI. Kryoskopie in organischen Lösungsmitteln und Röntgenographie.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine Zeitlang die Theorie eifrig diskutiert wurde, ob die Eiweißkörper nicht aus sehr kleinen Bausteinen aufgebaut und durch Bindungen irgendwelcher Art, die jedoch nicht Hauptvalenzbindungen seien, zu einem großen Molekül vereinigt seien. So meinte z. B. M. Bergmann (11a) in einem Vortrag vor der Gesellschaft deutscher Naturforscher, ob nicht zu erwägen sei: „. . . ob die Proteine nicht Molekülverbindungen sehr hoher Ordnung sind, ob ihr eigenartiges Verhalten nicht dadurch zustande kommt, daß ihre umfänglichen Aggregate aus einer Vielzahl verschiedenartiger Individualgruppen zusammengefügt sind."

Diese Theorie wurde besonders von N. Troensegaard und R. O. Herzog verfochten. Troensegaard und J. Schmidt (108a) teilten 1923 mit, daß sie die Gefrierpunktserniedrigung von, nach ihrer Methode azetylierten Proteinen, Spaltprodukten und von natürlichem Gliadin und Gelatine in organischen Lösungsmitteln gemessen und außerordentlich niedere Molekulargewichte gefunden hätten. Als Lösungsmittel dienten Eisessig, Phenol und Anilin (letzteres nicht bei natürlichen Eiweißstoffen). Die Proteine wurden sorgfältig getrocknet und man erhielt in Phenol für Gliadin 440, für Gelatine 356 als Molekulargewicht. Die Eisessigwerte wurden von den Autoren selbst angezweifelt.

R. O. Herzog und M. Kobel (51) lösten sorgfältig gereinigtes Seidenfriboin in Resorzin und erhielten Molekulargewichte von 145—150. Bei längerer Vorbehandlung stiegen die Molekulargewichte auf 202—215. Kresolextrakte von Seidenfibroin, die in Resorzin gelöst wurden, ergaben 314—380. Herzog stützte seine Ansicht, daß die Eiweißkörper aus solch kleinen Bausteinen aufgebaut seien, damit, daß er Röntgenaufnahmen nach der Debye-Scherrer-Methode von den Eiweißkörpern anfertigte (48a). Nur einige Eiweißkörper u. z. aus den Skleroproteinen ergeben Kristallinterferenzen. Alle anderen sind amorph, also für die Röntgenanalyse nicht verwertbar.

Kollagen zeigt einen amorphen und einen kristallinischen Anteil. Durch Andauung kann der amorphe Anteil herausgelöst werden und von dem verbleibenden Rest nahm Herzog an, daß er den Grundbaustein des Eiweißes, „die Elementarzelle", wie er sie nannte, darstelle. In jeder Elementarzelle, die er würfelförmig annahm, und deren Volumen er aus den röntgenographischen Daten errechnete, sollte 2 Moleküle sein, die dann beim Kollagen ein Molekulargewicht von 685, bei Seidenfibroin ein solches von 250—330, errechnet aus Volumen und spezifischem Gewicht haben sollten. Da er damit die hohe Anzahl von Aminosäuren, die aus dem Kollagen

analysiert worden waren, und die ein sehr hohes Mindestmolekulargewicht ergaben, nicht in Einklang bringen konnte, erklärte er, daß z. B. in Kollagen die Aminosäuren außer Glykokoll und Alanin nur „Verunreinigungen" darstellten. So weitgehende Schlüsse wie Herzog hat wohl kein Untersucher des Röntgenspektrums der Skleroproteine gezogen. Im Gegenteil, Meyer und Mark (76) leugnen die Aussagemöglichkeit über die Molekülgröße der Eiweißkörper aus den Röntgendaten ganz entschieden. Auch gegen die Kryoskopie der Eiweißkörper in organischen Lösungsmitteln, wie sie Herzog und Troensegaard durchgeführt hatten, wurde ein entscheidender Gegenbeweis durch E. J. Cohn und J. B. Conant (21) erbracht. Diese Autoren lösten die sorgfältig gereinigten und getrockneten Eiweißkörper in Phenol unter Zugabe eines Überschusses von festem getrocknetem Calciumchlorid. Dadurch wurde das überschüssige Wasser gebunden und es ergaben sich unmeßbar kleine Gefrierpunktserniedrigungen, also sehr hohe Molekulargewichte. Für Zein z. B. über 10.000 und für andere Eiweißkörper ähnliche Werte.

Troensegaard (108b) und Herzog (47) mußten bei nochmaliger Überprüfung ihre Ergebnisse den Untersuchungen Cohns und Conants beipflichten, daß ihre hohen Gefrierpunktserniedrigungen durch hygroskopisches Material verursacht worden seien.

VII. Spreitung und seltenere Methoden.

Das Verfahren der Spreitung von Eiweißkörpern besteht im Prinzip darin, daß man eine sehr kleine, gemessene Menge Eiweißlösung von bestimmtem Gehalt auf eine reine Wasseroberfläche bringt. Das Eiweiß breitet sich dann wie ein Tropfen Öl auf dem Wasser aus und bildet eine zusammenhängende Schicht. Die Fähigkeit des Eiweißes, sich auf der Wasseroberfläche auszubreiten, beruht auf dem Bestreben, die hohe Oberflächenspannung des Wassers zu erniedrigen. Die Häutchen, die das Eiweiß auf der Wasseroberfläche bildet, sind monolekular, wenn das Eiweiß keinen Widerstand beim Sichausbreiten findet. In einer monomolekularen Schicht sind die Moleküle in ganz bestimmter Weise orientiert. Die Lagerung der Moleküle in dem Oberflächenfilm ist besonders bei den Fettsäuren genau untersucht worden (s. Übersicht von Devaux 25), und es hat sich gezeigt, daß die gut polarisierbaren Gruppen, bei den Fettsäuren z. B. die COOH-Gruppe sich dem Wasser zu nähern suchen und daß sie bei monomolekularer Schichtung der Substanz auf dem Wasser stehen, während die apolaren Gruppen der Moleküle „bürstenartig" in die Luft ragen. Bei Fettsäuren konnte das dadurch von Langmuir nachgewiesen werden, daß die Homologen trotz verschiedener Kettenlänge den gleichen Raum zur Ausbreitung benötigen, da die COOH-Gruppen an einem Ende des Moleküls sitzen und die Ketten in die Luft ragen.

Devaux fand, „daß ein Albumintropfen, der auf Wasser gebracht wurde, sich auf Art des Öles ausbreitet, endgültige Dimensionen der gleichen Größenordnung annimmt und gleichzeitig eine richtige Koagulation erfährt. Denn er wird zu einer offenbar steifen Lamelle. Das Albumin ist also fähig, sich unter Einwirkung von Oberflächenkräften als Membran anzuordnen".

Wann eine monomolekulare Schicht vorhanden ist, zeigt sich einfach dann, wenn der Film keine Tendenz mehr hat, sich auszubreiten. Das wird dadurch festgestellt, daß man den Widerstand, den der Film dem Zusammendrücken entgegensetzt, mißt. Wenn dieser Widerstand seine kleinste Größe hat, ist der Film maximal ausgebreitet. Eine andere Methode, die von Lecomte du Nouy (82) gerade im Hinblick auf die Eiweißstoffe angegeben worden ist, basiert auf der Tatsache, daß die Oberflächenspannung dann am stärksten herabgesetzt wird, wenn monomolekulare Schichten vorhanden sind.

Die stärkste Erniedrigung der Oberflächenspannung bei Ovalbumin findet sich bei gleicher Oberfläche bei 3 verschiedenen hohen Konzentrationen, nämlich $\frac{1}{95.000}$, $\frac{1}{139.000}$ und $\frac{1}{193.000}$ (zit. nach Hercik 44b und W. Pauli 87b, da mir du Nouys Originalarbeit leider nicht zugänglich war). Da man annehmen darf, daß die größte Verdünnung einer Längslagerung der Mole-

küle in monomolekularer Schicht entspricht und die Dicke des Films aus der Größe der Oberfläche und der angewandten Konzentration sowie dem spezifischen Gewicht zu errechnen ist und jedes Minimum einer anderen Lagerung der Moleküle im Raum entspricht, so kann man die Molekularvolumina und durch Multiplikation mit dem spezifischen Gewicht die Molekularmasse und durch weitere Multiplikation mit der Avogadroschen Konstanten das Molekulargewicht errechnen. Das Molekulargewicht von Ovalbumin konnte darnach in fast völliger Übereinstimmung mit den Messungen Soerensens und Svedbergs zu 30.800 bestimmt werden. L. de Caro und La Porta (19, zit. nach Hercik 44) haben für Serumalbumin sehr gut mit den durch ultrazentrifugale Meßmethoden erhaltenen, übereinstimmende Werte gefunden. Für Myoprotein erhielt de Caro 3.200.000 als Teilchengewicht.

Mit der Erzielung von monomolekularen Eiweißschichten beschäftigten sich auch Gorter und Grendel (36a). Sie suchten aus der Größe der Oberfläche die Quantität der Eiweißkörper zu bestimmen. Sie benützten dazu einen Apparat, der dem Langmuirs nachgebildet war. Das Verfahren hatten sie bei der Bestimmung kleiner Quantitäten Fettsäuren (36b) entwickelt. Die Flüssigkeit wird dabei mit einer kapillaren Pipette horizontal auf die Oberfläche gebracht, sodaß keine Lösung eintritt.

Zocher und Stiebel (119a, b) beobachteten Filme verschiedener Substanzen ultramikroskopisch und fanden dabei, daß bei der Eiweißspreitung nach Gorter und Grendel ein Film mit Einlagerung zahlreicher grobkolloider Schollen entsteht.

Hercik (44) ein Schüler du Nouys nahm infolgedessen an, daß bei den Gorterschen Versuchen eine Denaturierung erfolgt sein müsse. Gorter und Seeder (37) maßen daraufhin die Dicke von Eiweißschichten nach ihren eigenen Verfahren und nach du Nouy. Sie kamen zu den gleichen Resultaten und schrieben den Unterschied zwischen ihren eigenen Ergebnissen und denen du Nouys dem Nichtbeachten der P_H und Salzkonzentration in den Lösungen du Nouys zu.

Bevor man noch wußte, von welcher Größenordnung die Eiweißmoleküle sind, wurden Molekulargewichtsbestimmungen, insbesondere von Peptonen und Albumosen mittels der Gefrierpunktserniedrigung und Siedepunktserhöhung durchgeführt. Abgesehen davon, daß bei Eiweißkörpern die Temperaturunterschiede viel zu klein sind, um auch nur annäherungsweise Zahlen zu ergeben, (entspricht doch ein osmotischer Druck von 1 cm Wassersäule einer Gefrierpunktserniedrigung von 8×10^{-50} °C nach Pauli und Valko (87a) spielen geringe Verunreinigungen, Aggregation und Spaltung. (letzteres sicher bei Siedepunktsbestimmungen) u. a. Effekte eine solch bedeutende Rolle, daß das Verfahren abzulehnen ist. Die Versuche der Molekulargewichtsbestimmungen nach dieser Methode sind auch schon vor 35 Jahren und da meist nur an Eiweißspaltprodukten unternommen worden.

So hat z. B. H. Schroetter (99) für Albumose aus Wittepepton ein Molekulargewicht von 625—715 ermittelt, bemerkt aber selbst dazu, daß bei Annahme eines Atoms Schwefel im Molekül ein Mindestmolekulargewicht von 2000 resultieren würde.

Eine Reihe von Versuchen sind von C. Paal (85a b, c) unternommen worden. Insbesondere sollten die Molekulargewichte von Peptonen ermittelt werden. Man erhielt für Glutinpeptone und Eieralbuminpeptone Werte von 400—2000 (der letzte Wert wurde allerdings von Paal bezweifelt), Ciamician und Zanetti (20, zit. nach Paal 85 a, b) erhielten für käufliche Albuminpeptone Molekulargewichte von 317—344 und von 529—555. A. Sabanejew (ebenfalls nach Paal) erhielt für, durch künstliche Verdauung gewonnenes Ovalbuminpepton ein Molekulargewicht unter 400, für Protalbumose 2500, Deuteroalbumose 3200. Paal erhielt für Glutin nach der Siedemethode 878—960, d. i. ungefähr 1/10 des heute angenommenen Wertes! M. Goto (35) erhielt für Clupeonsulfat nach der Gefrier- und Siedemethode ein Molekulargewicht von 419—423. Ähnliche Werte erhielten St. Bugarszki und L. Liebermann (17) für Albumin, Albumose und Pepsin.

Von Bechhold (10) wurde die Ultrafiltration als Mittel zur Vergleichung der relativen Molekülgröße der Kolloide untereinander angegeben. Er stellte für verschieden durchlässige Ultrafilter eine Skala auf, bei der die höchstdispersen Substanzen durch die feinsten Filter gehen. Die Skala geht von Berliner Blau über Platinsol (nach Bredig), Eisenhydroxydsol, Kasein, in Milch, Arsensulfidsol, Goldlösung (ca. 40) . . . Goldlösung (ca. 20), 1% Gelatinelösung, 1%ige Hämoglobinlösung, Serumalbumin, Diphterieantitoxin und endet schließlich bei den Protalbumosen.

M. Marinesco (72) gelangte durch Messungen der Dielektrizitätskonstanten von Gelatinelösungen zu einem Molekulargewicht von über 10.000 für Gelantine.

Für die Abhängigkeit des Molekulargewichts von der Viskosität in kolloiden Lösungen ist von Staudinger (104a) eine Formel für die Hochpolymeren aufgestellt worden, die jedoch bei den Eiweißlösungen infolge elektrostatischer Anziehungskräfte, Strukturbildung, Dissoziation versagt. Man konnte zwar in vielen Fällen einen symbaten Gang für Molekülabbau und Viskositätsverringerung finden, jedoch ein Gesetz, das die absolute Größe des Molekulargewichts der Eiweißkörper durch Viskositätsmessungen finden läßt, konnte nicht aufgestellt werden.

VIII. Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge.

The Svedberg (106a, b, c) konnte die modernste und schönste Art der Molekulargewichtbestimmung von Proteinen durchführen. Es bedarf dazu Zentrifugen, die ganz ungeheure Geschwindigkeiten zu entwickeln und für lange Zeit zu halten vermögen. Dann scheiden sich die Proteine und sogar molekulardisperse anorganische Substanzen aus den Lösungen aus und reichern sich an der Peripherie an. Svedberg berechnet die Molekulargewichte der Proteine auf 2 Arten:

1.) durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit,

2.) durch Beobachtung des Sedimentationsgleichgewichts.

Grundlage für seine Formeln ist das Stockessche Gesetz: wenn $6\pi\mu r v$ die Reibungskraft eines kugelförmigen Moleküls ist und $4/3\pi r^3(\rho_p - \rho_d)$ gr seine Schwerkraft (r = Teilchenradius, η = Viskosität des Mediums, v = Fallgeschwindigkeit, $\rho_p - \rho_d$ = Dichtedifferenz von Teilchen und Flüssigkeit), so ist:

$$6\,\pi\,\eta\,r\,v = {}^4/_3\,\pi\,r^3\,(\rho_p - \rho_d) \qquad (1)$$

wenn das Teilchen mit gleichmäßiger Geschwindigkeit herabfällt.

Voraussetzung für das Zutreffen des Stockesschen Gesetzes ist u. a. die Annahme einer inkompressiblen, zähen Flüssigkeit im Sinne der Hydrodynamik, „Langsamkeit" der Bewegung, Kugelgestalt des sich bewegenden Körpers. (Nach F. V. v. Hahn 41).

Wird statt der Erdanziehung die Zentrifugalkraft zur Erzielung des Falles der Kugel benützt, so kommt der Zusatzfaktor

$$6\,\pi\,\eta\,r\,v = {}^4/_3\,\pi\,r^3\,(\rho_p - \rho_d)\,w^2\,x \qquad (2)$$

(w = Winkelgeschwindigkeit und x = Entfernung zwischen dem Rotationszentrum und den Teilchen). Durch Differenzieren nach dt und Integrieren von x^1 nach x^2:

$$r = \sqrt{\frac{9}{2}\;\frac{\eta \ln \frac{x^1}{x^2}}{(\rho_p - \rho_d)\,w^2\,t}} \qquad (3)$$

Beim Zentrifugieren wird die durchsichtige Zelle, in der sich die Lösung befindet, ca. alle 5 Minuten in Licht von solcher Wellenlänge photographiert, daß sich geeignete Schwärzung der Platte ergibt. Auf einer anderen Platte wird die Lösung in verschiedener Verdünnung und bei denselben Lichtverhältnissen photographiert. Die Konzentrationsverteilung kann dann mit selbstzeichnenden Photometern aufgezeichnet werden. Eine andere Art der Konzentrationsmessung in der Zentrifugenzelle besteht darin, eine Skala, die unter der Lösung liegt, im nichtadsorbiert werdenden Licht durch die Lösung hindurch zu photographieren und die Verschiebung der Skalenteil-

striche, die infolge der Brechung statthat, zur Konzentrationsbestimmung zu benützen.

Man mißt bei homodispersen Suspensionen die Konzentration in einer bestimmten Entfernung vom Boden der Zentrifugenzellen nach einer gewissen Zentrifugierungszeit. Man kann dann mit Hilfe von Verteilungskurven auf den Teilchenradius schließen. Bei heterodispersen System geht man von der Überlegung aus, daß die großen Teilchen rascher sedimentieren und daß jeder Fallhöhe eine bestimmte Konzentration entspricht. Die Beziehung zwischen dem Teilchenradius und der Fallhöhe ist aber mit dem Stokesschen Gesetz gegeben.

Die schließliche Berechnung des Molekulargewichts gestaltet sich bei isoelektrischen Eiweißkörpern auf Grund ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit als:

$$\mathfrak{M} = \frac{\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}\,s}{\mathfrak{D}\,(1-v\rho)} \qquad (4)$$

D, die Diffusionskonstante muß auf gewöhnlichem Wege bestimmt werden. Da sie aber oft anormal ist, wird die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit weniger zum Bestimmen des Molekulargewichts als vielmehr zur Bestimmung der Hetero- und Homodispersität einer Eiweißlösung benützt.

$$s = \frac{dx}{dt}\,\frac{1}{w^2\,x}\,\frac{\eta}{\eta_0}\,\frac{1-v\,\rho_0}{1-v\,\rho} \qquad (5)$$

s = Sedimentationskonstante $\frac{dx}{dt}$ = Sedimentationsgeschwindigkeit,
w = Winkelgeschwindigkeit x = Abstand von der Rotationsachse
η = Viskosität des Lösungsmittels
η_0 = Viskosität von Wasser bei gleicher Temperatur
ρ = spezifisches Gewicht des Lösungsmittels
ρ_0 = spezifisches Gewicht von Wasser
v = partielles spez. Volumen der gelösten Substanz.

Zeigt die Sedimentationskonstante bei zu- oder abnehmendem x einen Gang, so ist das zentrifugierte System heterodispers. Die Sedimentationskonstanten können dann in die obere Gleichung (5) eingesetzt werden.

Durch Messung des Sedimentationsgleichgewichts ergibt sich das Molekulargewicht einer homodispersen Lösung aus Gleichung:

$$\mathfrak{M} = \frac{2\,\mathfrak{R}\,\mathfrak{T}\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}{(1-v\rho)\;w^2\;(x_2^2-x_1^2)} \qquad (6)$$

R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, c_2 und 1_1 sind die Konzentrationen von x_2 und x_1, sonstige Zeichen wie oben.

Durch Kombination von Gleichung (4) und (6) lassen sich Abweichungen der Moleküle von der sphärischen Gestalt erkennen. Der Einfluß der Gegenionen der Eiweißkörper bei Messungen außerhalb des isoelektrischen Punktes kann durch Zusatzstoffe eliminiert werden, da dann das Zentrifugalpotential, das dem Membranpotential durchaus entspricht, (es handelt sich ja auch hier um ein Donnansches Membrangleichgewicht), vermindert wird.

Die Versuchungseinrichtung besteht aus einer Zentrifuge mit elektrischem, oder bei ganz hohen Geschwindigkeiten mit Oelturbinen-Antrieb. Die Lösungen der Eiweißstoffe müssen etwa 2—22 mm dick und 4—12 mm hoch sein. Ihr Abstand vom Rotationszentrum soll nicht weniger als 5 mm betragen und die Temperatur soll während des Versuchs konstant, die Umlaufszeit möglichst lange innegehalten werden können. Es sind im Svedbergschen Laboratorium Zentrifugen für Gleichgewichtsbestimmungen im Gebrauch, die eine Zentrifugalkraft von 16.000facher Erdanziehung (= 18.000 Umdrehungen/Minute) entwickeln. Für Bestimmungen der Sedimentationsgeschwindigkeit werden Rotoren benützt, die Zentrifugalfelder bis zu 400.000 mal der Erdanziehung (= 78.000 Umdrehungen/Minute) aushalten. Bei Beschränkung des Zellabstandes vom Rotationszentrum auf 36 mm konnten Zentrifugalfelder vom 700.000fachen der Erdschwere (= 30.000 Umdrehungen/Minute) erreicht werden. Der Zentrifugenstator ist in einen Wasserthermostaten eingelassen, der Rotor besteht aus Chromnickelstahl und wird von Wasserstoff von gleichbleibender Temperatur umspült. Die beiden Zentrifugenzellen bestehen an 2 gegenüberliegenden Seiten aus Bergkristallplatten, sodaß durch sie hindurch Licht einfallen kann. Die eine wird mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt, die andere dient als Gegengewicht.

Svedberg fand bei seinen Untersuchungen, daß die meisten Eiweißstoffe monodispers sind, daß aber bei Über- oder Unterschreitung der P_H-Stabilitätsgrenze reversibler Zerfall bzw. Aggregation der Eiweißstoffe eintritt. Pauli (87b) hält es allerdings für möglich, daß hier die elektrischen Kräfte zwischen Proteinion und Gegenion eine entscheidende Rolle spielen, und die obengenannten Formeln zur Molekulargewichtsbestimmung nicht mehr gelten. Svedberg vermutet einen Zusammenhang der Dissoziation der Moleküle bei Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration mit der bemerkenswerten Tatsache, daß das niedrigste Molekulargewicht eines Eiweißkörpers, das bis jetzt von Svedberg gefunden wurde, 34.500 ist und die Molekulargewichte der meisten anderen Eiweißstoffe anscheinend Vielfache davon sind. (In gewissen Proteinen kommen auch in Mischung mit anderen, Moleküle von $^1/_2 \times 34.500$ vor.). Für Ovalbumin wurde ein Molekulargewicht von 34.500, für Hämoglobin ein Molekulargewicht von 69.000 in sehr guter Übereinstimmung mit Sørensen und Adair festgestellt. Wie hoch die Molekulargewichte von Eiweißkörpern sein können, zeigt das Hämocyanin aus Helixblut, nämlich 6.600.000. Es sind ev. Eiweißkörper mit noch riesigeren Molekülen vorhanden.

Die beigefügte Tabelle gibt nach Svedberg die wichtigsten Molekültypen der Eiweißstoffe. Polydispers sind: Euglobulin, Fibrinogen, Gelatine, Gliadin, Globin, Glutenin, Histon, Kasein, Laktalbumin, Legumelin, Leukosin, Ovoglobulin und Pseudoglobulin (zit. nach Pauli 79a). Nach Svedberg sind diese Eiweiße im nativen Zustand isodispers und werden durch die Isolierung und Reinigung polydispers. Kaseinauszüge mit heißem, angesäuertem Alkohol waren homodispers und hatten ein Molekulargewicht von 375.000 ± 11.000.

Bestünden die Eiweißkörper aus langen Hauptvalenzketten, so ist trotzdem eine Kugelform des Gesamtmoleküls anzunehmen, da sich die Kette infolge der vielen Kohäsionskräfte verbiegen würde (nach Sørensen).

Diese Ansicht steht allerdings im Widerspruch mit Staudinger 106a), der seine Polystyrole als lange, starre, dünne Stäbe auffaßt.

Die Molekulargewichtsbestimmungen der Eiweißkörper sind heute am sichersten mit der Svedbergschen Methode durchzuführen, wenn auch gewisse andere Möglichkeiten bestehen. Wir haben in den einzelnen Kapiteln gesehen, wie die Biochemiker das Eiweißmolekül erst als Molekül vom Molekulargewicht 5000—10.000 annahmen, wie Emil Fischer noch ein Molekulargewicht von 12.000—15.000 für „höchst zweifelhaft" (zit. n. Plimmer) erklärt hat und welch rieisge Werte heute von uns anerkannt werden müssen.

Sollten tatsächlich, wie es den Anschein hat, die Molekulargewichte der Eiweißkörper ganze oder halbe Vielfache von 34.500 darstellen, so wäre damit eine neue Fragestellung gegeben, die durch die Forschungen Svedbergs entstanden ist und deren Beantwortung vielleicht das Eiweißmolekül einen großen Schritt der Aufklärung näher bringen würde.

Wichtigste Molekültypen der Eiweißstoffe (nach Svedberg).

Anzahl der Einheiten 34.500	Molekulargewicht	Beispiel des Vorkommens.
1/2*	17.300	Petromyzonblut (Erythrocrourin)
		Säugetiermuskeln (Myoglobin
1	34.500	Vogelei (Ovalbumin)
		Arcablut (Erythrocruorin)
		Pankreas (Insulin)
		Magensaft (Pepsin)
2	69.000	Säugetierblut (Serumalbumin)
		Säugetierblut (Hämoglobin)
3	104.000	Rotalgen (Phykocyan)
		Limulusblut (Hämocyanin)
4	138.000	Säugetierblut (Serumglobulin)
6	207.000	Rotalgen (Phykoerythrin)
		Hanfsamen (Edestin)
		Mandel (Amandin)
		Wicke (Legumin)
12	414.000	Daphniablut (Erythrocruorin)
		Langustenblut (Hämocyanin)
24	828.000	Hummerblut (Hämocyanin)
		Limulusblut (Hämocyanin)
48	1.650.000	Planorbisblut (Erythrocruorin)
		Limulusblut (Hämocyanin)
		Skorpionblut (Hämocyanin)
96	3.300.000	Arenicolablut (Erythrocruorin)
		Sabellablut (Chlorocruorin)
		Sepiablut (Hämocyanin)
		Limulusblut (Hämocyanin)
192	6.600.000	Helixblut (Hämocyanin)

* nur in Mischung mit nächst höheren Molekulargewicht beobachtet.

IX. Schlußwort.

Die kleinsten Einheiten der meisten Eiweißkörper werden durch chemische Behandlung leicht zerlegt. Man erhält daher in vitro Gemische von verschieden großen Molekülen. Nur bei zwei Eiweißkörpern sind auf verschiedenen Wegen übereinstimmende Teilchengewichte festgestellt worden: bei Eieralbumin erhielt man 34.500 und bei Hämoglobin der verschiedensten Säugetiere 68.000—69.000. Ob diese Größe mit dem Molekulargewicht im klassischen Sinne identisch ist, d. h. ob sie tatsächlich das Gewicht von N Teilchen, deren Atome unter einander durch Hauptvalenzen verbunden sind, wiedergibt. läßt sich nicht sagen.

An dieser Stelle möchte ich mir gestatten, Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. Otto Frank, München und Herrn Prof. Amandus Hahn, München für alle erwiesene Freundlichkeit meinen besten Dank auszusprechen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Siegfried Edlbacher für die Bereitwilligkeit zur Übernahme des Referates.

Literaturverzeichnis.

1a **Abderhalden, E.:** Naturw. $12,_{719}$ (1924).

b **Abderhalden, E. und Brockmann, H.:** Biochem. Z. $211,_{395}$ (1929).

2 **Adamson, L. und Roaf:** Biochem. Journ. $3,_{422}$ (1908).

3a **Adair G. S.:** Proc. Roy. Soc., London $108,_{627}$ (1925)7.

b $109,_{292}$ (1925).

c $120,_{573}$ (1928).

d $126,_{160}$ (1929).

e Scand. Archiv f. Physiol. (1926), Verh. d. 12. intern. Physiol. Kongresses.

f Trans. Faraday Soc. $23,_{536}$ (1927).

g Journ. of Physiol. $67,_{288}$ (1929).

4 **Adair, G. S. und Callow, E. H.:** Journ. of Gen. Physiol. $13,_{819}$ (1929—1930).

5 **Adair, G. S. und Robinson, M. E.:** Biochem. Journ. $24,_{1864}$ (1930).

6 **Arrhenius Svante:** Immunochemie, Leipzig 1907.

7 **Atkin und Douglas:** Journ. Soc. Leather Trde Comp. $8,_{259}$ (1916).

8 **Baranetzki:** Poggendorfs Annalen $147,_{234}$ (1872).

9 **Barger, G.:** J. Chem. Soc. London 85 I, $_{286}$ (1904).

10 **Bechhold:** Die Kolloide in der Medizin Dresden und Leipzig.

11a **Bergmann, M.:** Berichte d. d. chem. Ges. $59,_{2973}$ (1926).

b $62,_{1963}$ (1929).

12a **Biltz, W.:** Z. physik. Ch. $83,_{625,\,689}$ (1913).

b $91,_{719}$ (1916).

c **Biltz, W. und Vegesack, A. v.:** Z. physik. Ch. $123,_{292}$ (1926).

13 **Bleyer, B. und Seidl:** Biochem. Z. $128,_{48}$ (1922).

14 **Brintzinger, H.:** Z. f. anorg. Ch. $168,_{945}$ (1928).

15 **Brintzinger, H. und W.:** Z. f. anorg. Ch. $196,_{33}$ (1931).

16a **Brintzinger, H. und Trommer, B.:** Z. f. anorg. Ch. $172,_{426}$ (1928)

b $184,_{97}$ (1929).

17 **Bugarszky, St. und Liebermann, L.:** Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol. $11,_{343}$ (1929).

18a **Burk, N. F. und Greenberg, D. M.:** Programm der Dr. Dissertation (Univ. Calif.) Mai 29.

b J. Biol. Chem. $87,_{197}$ (1930).

c $98,_{353}$ (1932).

19 **Caro, L. de und Laporta, M.:** Arch. scienze biol. $14,_{264}$ (1930).

20 **Ciamician und Zanetti:** Ann. Chim. Farm $16,_{17}$ (1892) Bericht in Maly 1892.

21 **Cohn, E. J. und Conant, B.:** Z. f. physiol. Chem. $159,_{93}$ (1926).

22 **Cohn, E. J., Hendry, J. L. und Prentiß, A. M.:** Journ. Biol. Chem. $63,_{721}$ (1925).

23 **Cohnheim, O.:** Chemie der Eiweißkörper, Braunschweig 1911.
24 **Dabrovski:** Bull. Acad. Sc. Cracovie, Classe math. et nat. A, Juni 1922 S. 485.
25 **Devaux, H.:** Koll. Z. $58_{,129}$ (1932).
26 **Dimroth:** Annalen der Chemie $399_{,91}$ (1913).
27 **Dreser:** Archiv f. exp. Path. und Pharm. $29_{,314}$ (1892).
28 **Einstein, A.:** Ostwalds Klassiker d. ex. Wissensch. Nr. 199 (Leipzig 1922).
29a **Eggert, J. und Bincer, H.:** Biochem. Z. $247_{,85}$ (1932)
b $256_{,239}$ (1932).
30 **Eggert, J. und Reitstötter:** Z. physik. Ch. $123_{,363}$ (1929).
31 **Euler, H. v.:** Chemie der Enzyme I. Bd., München 1925.
32a **Fodor, A.:** Das Fermentproblem, Dresden 1929.
b Biochem. Z. $240_{,140}$ (1931).
33a **Frankel, M.:** Biochem. Z. $240_{,140}$ (1931).
b Biochem. Z. $249_{,476}$ (1932).
34 **Freundlich:** Kapillarchemie, Leipzig 1930.
35 **Goto, M.:** Z. physiol. Ch. $37_{,84}$ (1902).
36a **Gorter, E. und Grendel:** Biochem. Z. $201_{,770}$ (1929)
b 192, (1926).
37 **Gorter, E. und Seeder:** Koll. Z. $61_{,246}$ (1932).
38 **Govaerts:** Bull. De l'Acad. Roy. de Méd. de Belg. $4_{,161}$ (1924).
39 **Gerngroß:** Z. angew. Ch. $38_{,85}$ (1925).
40 **Graham, Th.:** Abhandl. üb. Dialyse. Ostwalds Klassiker d. ex. Wiss. Nr. 179, Leipzig 1911.
41 **Hahn, F. V. v.:** Dispersoidanalyse, Dresden 1928.
42a **Haller, W.:** Koll. Z. $49_{,74}$ (1929).
b $56_{,257}$ (1931).
43 **Handovsky, H.:** Oppenheimer: Hdb. d. Bioch., Erg. Werk I, Jena 1933.
44 **Hercik:** Koll. Z. 56 (1931).
45 **Hammarsten:** Bioch. Z. $147_{,481}$ (1925).
46a **Herzog, R. O.:** Z. f. Elektroch. $13_{,533}$ (1907).
b $16_{,1003}$ (1910).
c $17_{,679}$ (1911).
d Berichte d. d. chem. Ges. $58_{,1257}$ (1925).
e Koll. Z. $39_{,250}$ (1926).
47 **Herzog, R. O. und Cohn, E.:** Z. physiol. Ch. $169_{,305}$ (1927).
48a **Herzog, R. O. und Gonell:** Berichte d. d. chem. Ges. $58_{,2228}$ (1925).
b Z. physiol. Ch. $152_{,18}$ (1926).
49 **Herzog, R. O., Hofmann, H. und Kratky:** Oppenheimer: Hdb. d. Bioch., Erg. Bd. 1930.
50 **Herzog, R. O. und Kasarnowski:** Biochem. Z. $11_{,172}$ (1908).
51 **Herzog, R. O. und Kobel, M.:** Z. physiol. Ch. $134_{,296}$ (1924).
52 **Herzog, R. O. und Polotzky:** Z. phys. Ch. $87_{,449}$ (1914).
53 **Herzog, R. O. und Spurlin, M.:** Z. f. physik. Ch., Bodensteinfestbd., $_{239}$ (1931).

54 Highfield, A.: Z. f. physik. Ch., Bd. 124_{245} (1926).
55a Hitchcock: J. Gen. Physiol. 4_{733} (1922).
b 5_{2} (1923).
56 Horne, E. B.: Biochem. J. 18_{1167} (1924).
57 Huang und Wu: Chin. J. Physiol. 4_{221} (1930).
58a Hüfner und Ganßer Engelmanns Archiv f. Physiol. 1907_{209}.
b 1894_{130}.
59 Jakobs F.: Biochem. Z. 58_{343} (1913).
60 Jakobs F. und Heubner: Biochem. Z. 58_{353} (1913).
61 Jamakami: Biochem. J. $14_{183, 522}$ (1920).
62 Karrer Paul: Polymere Kohlehydrate, Leipzig 1925.
63 Karrer Paul: Lehrb. d. org. Chemie, Leipzig 1933.
64 Koeppe: Archiv f. d. ges. Physiol. 62_{571} (1896).
65 Krüger D. und Grunsky H.: Z. physik. Ch. A. 150_{115} (1930).
66 Kunitz M.: J. Gen. Physiol. 10_{811} (1926/27).
67 Laqueur und Sackur: Hoffmeisters Beitr. 3_{1932} (1902).
68 Lillie R. S.: Amer. Journ. Physiol. 20_{127} (1907/08).
69 Lloyd D. J.: Biochem. J. 14_{147} (1920).
70 Loeb J.: Die Eiweißkörper und die Theorie d. koll. Erscheinungen, Berlin 1924.
71 Mac Bain J. W., Dawson C. R. und Barker H. A.: J. Amer. Chem. Soc., Bericht in Koll. Ztschr. 68 (1935).
72 Marinesco N.: Kolloid Z. 58_{285} (1932).
73a Marrack J. und Hewitt L. F.: Biochem. J. 21_{1121} (1927).
b 23_{1079} (1929).
74 Martin C. R.: J. of Physiol. 20_{364} (1896).
75 Meyer K. H. und Mark H.: Berichte d. d. chem. Ges. 61_{1945} (1928).
76 Meyer K. H. und Mark H.: Aufbau der hochpolymeren org. Naturstoffe, Leipzig 1930.
77 Moore B. und Parker W. H.: Amer. J. of Physiol. 7_{262} (1902).
78a Moore B. und Roaf H. E.: Biochem. J. 2_{34} (1907).
b 6_{110} (1911).
79 Moore B. und Roaf H. E.: Koll. Z. 13_{133} (1913).
80a Moore B., Whitley und Webster: Biochem. J. 6, (1911).
b 7_{142} (1913).
81 Northorp J. N. und Anson M.: J. of Gen. Physiol. 12_{543} (1928/29).
82 Nouy, P., Lecomte du: Surface equilibria, New-York 1925.
83 Ostwald Wo.: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen, Dresden und Leipzig 1927.
84a Ostwald Wo.: Koll. Z. 49_{60} (1929).
b Z. physik. Ch. A 159_{375} (1932).
85a Paal C.: Berichte d. d. chem. Ges. 25_{1202} (1892).
b 27_{1827} (1894).
c 35_{2195} (1902).
86 Pauli Wo.: Biochem. Z. 127_{150} (1921).
87a Pauli W. und Valko E.: Elektrochemie der Kolloide, Wien 1929.
b Kolloidchemie der Eiweißkörper, 2. Aufl. 1934.
88 Pfeffer: Osmotische Untersuchungen, Leipzig 1877.

89 Pfyl: Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt $47_{,350}$ (1917_1).
90 Procter: Journ. Chem. Soc. $105_{,313}$ (1914).
91 Procter: H. R. und Wilson J. A.: Journ. Chem. Soc. $109_{,107}$ (1916).
92 Przylecki St. J. von und Grynberg M. Z.: Biochem. Z. 270, (1934).
93a Reid E. W.: Journ. of Physiol. $31_{,438}$ (1904).
$33_{,12}$ (1905).
94 Ringer E. W.: Z. f. physiol. Ch. $135_{,84}$ (1924).
95a Roaf: Journ. of Physiol. 38, (1909).
b Quart. Journ. Exper. Physiol. $3_{,71,171}$ (1910).
96 Roche J. u. A., Adair G. S. u. M. E.: Biochem. J. $26_{,1811}$, (1932_{II}).
97 Schulz F. N.: Die Größe des Eiweißmoleküls, Jena 1903.
98a Schulz G. V.: Z. physik. Ch. A. $158_{,237}$ (1932).
b $159_{,374}$ (1932).
c $160_{,403}$ (1932).
d $161_{,441}$ (1932).
99 Schroetter H.: Monatsh. f. Ch., Bd. 14, (1893).
100 Smith C. R.: J. Amer. Chem. Soc. $43_{,1350}$ (1921).
101 Spiegel-Adolf Mona: Die Globuline, Dresden 1920.
102a Sørensen S. P. L.: Z. f. physiol. Ch. 106, (1918).
b Proteins, The Fleischmann Co., New-York 1925
c Koll. Z. $53_{,102}$ (1930).
103a Starling E H.: Journ. of Physiol. $19_{,312}$ (1895/96).
b $24_{,317}$ (1899).
104 Staudinger H.: Die hochmolekularen org. Verbindungen, Berlin 1932.
105 Stiasny: Collegium $1920_{,529}$.
106 Svedberg The: Koll. Z. $51_{,10}$ (1930).
b Kolloidchemie, Leipzig 1925.
c Hdbch. d. biol. Arbeitsmethoden.
107 Tiselius und Groß: Koll. Z. 66_{11}.
108a Troensegaard N. und Schmidt J.: Z. f. physiol. Ch. $133_{,116}$ (1923).
b $167_{,312}$ (1927).
109 Veth af Ugglas: Biochem. Z. $61_{,469}$ (1914).
110 Verney E. B.: J. of Physiol. $61_{,319}$ (1926).
111 Waldschmidt-Leitz E.: Berichte d. d. chem. Ges. $59_{,1007}$ (1926).
112 Waldschmidt-Leitz, Ziegler F., Schäffer A., Weil L.: Z. f. physiol. Ch. $197_{,219}$ (1931).
113 Weber H. H. und Stöver R.: Biochem. Z. $259_{,269}$ (1933).
114 Van der Wijk: Oppenheimer, Hdbch. d. Biochemie, 2. Aufl., Erg. Werk I, Jena 1933.
115a Wilson H. C.: Biochem. J. $17_{,59}$ (1923).
b $19_{,80}$ (1925).
116 Wintgen und Krüger: Koll. Z. $28_{,81}$ (1921).
117 Wintgen und Löwenthal: Koll. Z. $34_{,292}$ (1924).
118 Wintgen und Vogel: Koll. Z. $30_{,47}$ (1922).

119a **Zocher F. und Stiebel F.:** Naturw. $16_{,72}$ (1929).
b Z. physik. Ch., A $147_{,401}$ (1930).
120 **Zsigmondy:** Kolloidchemie, Leipzig 1925/27, 5. Aufl.

Außerdem wurden benützt:

Edlbacher S.: Stukturchemie der Aminosäuren und Eiweißkörper. Leipzig und Wien 1927.
Encyklopädie der technischen Chemie, 2. Aufl., Berlin 1929.
Findlay und Cohen: Der osmotische Druck, Leipzig.
Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.
Hatschek E.: Die Viskosität der Flüssigkeiten, Dresden und Leipzig 1925.
Haurowitz F.: Biochemie seit 1914, Dresden und Leipzig 1925.
Keßtner O.: Chemie der Eiweißkörper, Braunschweig 1925.
Liesegang R. E.: Kolloidchem. Technologie, Dresden und Leipzig 1927. Biologische Kolloidchemie, Wissensch. Forschungsber. Bd. XX.
Osborne: The vegetable Proteins (Monographs on Biochemistry), London.
Oppenheimer: Die Fermente Bd. I.
Ostwald W.: Grundriß der Kolloidchemie, Dresden 1910.
Plimmer und Matula: Chem. Konst. der Eiweißkörper, Dresden-Leipzig 1914.
Robertson: Physikalische Chemie der Proteine, Dresden 1912.